

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**  
**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS**  
**DEPARTAMENTO DE ECOSISTEMAS AGROFORESTALES**



**Artrópodos depredadores potenciales de *Ceratitis capitata***  
**(Wiedemann) presentes en el suelo de cítricos**

**TESIS DOCTORAL**

**CÉSAR MONZÓ FERRER**  
**Ingeniero Agrónomo**  
**2010**



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**  
**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS**  
**DEPARTAMENTO DE ECOSISTEMAS AGROFORESTALES**



**Artrópodos depredadores potenciales de *Ceratitis capitata***  
**(Wiedemann) presentes en el suelo de cítricos**

Memoria presentada por César Monzó Ferrer  
Para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo

Vº Bº de los directores

Directores: Dr. Pedro Castañera Domínguez      Dr. Alberto Urbaneja García

Tutor: Dr. Francisco Ferragut Pérez

**Valencia, 2010**







La realización de una tesis doctoral es un proceso laborioso y complejo en el que a parte del doctorando, se ven implicados un gran número de personas que de muy diversas maneras ayudan a la consecución de dicho proyecto. En mi caso, es seguro que sin todas las aportaciones de tanta gente, el resultado final habría sido imposible. Por esta razón quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a todas esas personas que a lo largo de los últimos 5 años han colaborado en la realización del presente trabajo así como en mi formación.

En especial quiero reconocer la inestimable labor en la dirección que han realizado mis dos directores de tesis, el Dr. Pedro Castañera y el Dr. Alberto Urbaneja. Me considero una persona privilegiada al poder haber tenido la oportunidad de disfrutar de esta dupla tan excepcional. Sinceramente creo que es casi imposible complementarse mejor en la dirección de un trabajo. Gracias por haberme enseñado tanto en esto de la investigación y por haberme brindado la oportunidad de poder trabajar en este apasionante mundo. Debido a vuestro impecable trabajo y absoluta implicación todo ha resultado muy cómodo. Creo que es un privilegio el haber podido tener la oportunidad de trabajar con cierta profundidad en tan diversos temas como los que aquí se presentan. Gracias por la inusual cantidad de medios y personal que me habéis facilitado. Por todos los buenos consejos que han sido determinantes en el diseño, desde un principio, de unas líneas de trabajo claras, sin apenas vacilaciones. Por los innumerables contactos que me habéis facilitado con tantos expertos en tan diversas materias fundamentales en el esqueleto del presente trabajo y en el de mi formación como investigador.

Quiero mostrar también mi especial agradecimiento a la Dra. Beatriz Sabater y al Dr. José Luis García. Ellos han tenido que ver mucho en una parte importante de esta tesis. Mis maestros particulares en todo lo biotecnológico de este trabajo. Pedro y José Luis, ha sido una oportunidad única el poder investigar en el CIB con vuestros grupos. Además, creo que el estar trabajando durante tanto tiempo en el grupo de microbiología para el desarrollo sostenible, coordinado por José Luis, me ha enriquecido mucho con enfoques en investigación bastante diferentes a los de mi formación en entomología. Durante mis dos estancias en el CIB siempre me he sentido como en casa, tanto en lo profesional como en lo humano.

Por otro lado, también quiero reconocer y agradecer el fundamental trabajo taxonómico realizado por distintos especialistas para las primeras determinaciones a nivel de especie de todos los artrópodos depredadores estudiados en este trabajo: a Antonio Melic, por su colaboración en las determinaciones de arañas, a Raimundo Outerelo y Purificación Gamarra en las de los estafilínidos, a Ildefonso Ruiz en la de los carábidos y cicindélidos, y a Felipe Pascual en la de los dermápteros.

Nunca me voy a olvidar tampoco de mi pequeño equipo de trabajo del IVIA, con el que tantas cosas he vivido. Helga, mi compañera de aventuras, gracias por tu incondicional apoyo más allá de lo profesional. Sabes que también tienes mucho que ver en los procesos construcción de esta tesis. Pili, mi primera maestra de depredadores polífagos y apoyo fundamental, a todos los niveles, en el cierre de la tesis. Oscar Molli, mentor particular en la taxonomía de artrópodos y en especial de arañas, y compañero en tantas horas de lupa ¡Qué bueno que aterrizaras por aquí ese día de eclipse total! Y María, ha sido un placer compartir contigo tantos proyectos durante estos últimos dos años ¡Seguimos en ello!

También quiero mencionar toda la ayuda prestada por Tati, primera compañera de muestreos, y Araceli y Ana durante sus estancias de prácticas en el IVIA.

Y Vicky! Muchas gracias por todo tu apoyo prestado a pesar de no haber estado directamente implicada en este proyecto. Aprecio un montón todas tus aportaciones para el diseño y realización de este documento así como todos tus acertados consejos durante estos años.

Raquel, mi compañera de tesis con la que he compartido tantos momentos. Cristian, a parte de compañero amigo ya de tantos años.

Quiero agradecer también a toda la gente que ha pasado por entomología en el IVIA, que ha hecho tan ameno el trabajo y que siempre ha estado dispuesta a colaborar en lo que fuese necesario. A Francesc, Nacho, Sara, Dembi, Poli, Laura, Tina, Consuelo, Manu, Jose, Michelangelo, Miquel, Sandra, Marta, Joel, Elena, Belén, Alejandro, Pablo, M<sup>a</sup> José, Paco, Alfons, M<sup>a</sup> Jesús...

De la misma manera quiero agradecer todo el apoyo prestado a la gente que estuvo trabajando y conviviendo conmigo durante mis estancias en el CIB: Gema, Bea, Patxi, Angel, Fernando, Carolina, Matoya, Marisa, Pedro Hernández, Felix, Isabel, Ana, Santiago, Ruben...

También quiero reconocer especialmente la implicación que el Dr. Josep Jacas ha tenido en este trabajo. Gracias por estar siempre dispuesto a aconsejarnos desde tu experiencia en cualquier aspecto de este trabajo, ya sea diseño experimental, elaboración de manuscritos, etc.

Agradezco también el trabajo desinteresado realizado por los tres revisores de esta tesis, el Dr. Josep Jacas, la Dra. Beatriz Sabater y la Dra. Gema Pérez Farinós. Vuestras aportaciones han ayudado mucho a enriquecer y mejorar este documento. Y a Nuria Agustí y Tomás Cabello, por sus sabios consejos en los inicios de los estudios de detección de presas por técnicas moleculares y de respuesta funcional.

Por último también quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos,

a Martí Llavador, José Luis Ripollés, Aureli, y Vicent Borrás, por habernos facilitado parcelas comerciales donde poder realizar nuestros estudios.

a Paco Ferragut, tutor en esta tesis, persona que me descubrió la oportunidad del IVIA, y con la que inicié mis primeras andaduras en este mundo del control biológico.

al Consejo Superior de Investigaciones Científicas por facilitarme la beca de Unidades Asociadas que ha permitido sustentar gran parte de esta investigación durante los últimos 4 años.

a TRAGSA, por la ayuda prestada para el diseño de alguno de los experimentos.

a Jordi Pérez y Emilio Carbonell por sus consejos y grandes aportaciones en el tratamiento estadístico de nuestros datos.

a Vicent Martí, por descubrirme la riqueza antropológica de esto tan antiguo que es la agricultura.

a Lola Massanet, mi maestra de lo sutil.

a mis compañeros de yoga.

a mis amigos, a mis padres, resto de familia, Jose, Bea, David y Pili.







# Resúmenes



La mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* (Wiedemann) es una de las plagas más importantes en la fruticultura mundial. En España, por su gran repercusión económica, se le considera como una de las plagas más graves de los cítricos. Tradicionalmente el control de esta especie se ha basado en la aplicación de tratamientos químicos. Sin embargo, la repercusión medio ambiental de los plaguicidas, sus efectos secundarios tanto sobre la fauna útil presente en el cultivo como sobre la salud humana, y los elevados costes de cultivo que suponen, han llevado a la búsqueda de nuevas alternativas para la gestión de esta plaga. En este contexto, el control biológico aparece como una herramienta muy poco explotada para esta plaga. Tanto las larvas de tercer estadio como las pupas y los adultos recién emergidos pueden darse en el suelo de los cítricos. Por esta razón, en la presente tesis se ha estudiado en profundidad la importancia de los depredadores polífagos que habitan el suelo de los cítricos y su influencia sobre *C. capitata*.

Se ha establecido que el suelo del agroecosistema cítricos alberga un rico y abundante complejo de depredadores polífagos. De hecho, en tres años de muestreos se capturaron 17.526 especímenes adultos de artrópodos depredadores, agrupados en 110 especies diferentes. Los grupos más importantes fueron el orden Araneae, con 52 especies encontradas y el 29,2% del total de capturas, las familias Staphylinidae y Carabidae del orden Coleoptera, con 34 y 19 especies encontradas y el 40% y 14,1% del total de capturas respectivamente, y el orden Dermaptera, con 4 especies diferentes y el 14,4% del total de capturas. Todos estos grupos de depredadores, así como las especies más representativas de cada uno de ellos, mostraron patrones fenológicos distintos, de manera que en cualquier momento del año se encontró actividad de alguno de los representantes de este complejo. Además, se observó influencia de la gestión de la cubierta vegetal en la abundancia de estos depredadores. En las parcelas donde existía una cubierta vegetal, espontánea o cultivada, se obtuvo una mayor abundancia de depredadores polífagos.

En laboratorio, los tres depredadores más abundantes, la araña *Pardosa cribata* Simon, el carábido *Pseudoophonus rufipes* (De Geer) y el dermáptero *Forficula auricularia* L., utilizaron como presa alguno de los tres estados de desarrollo de *C. capitata* que se pueden encontrar en el suelo. Tras obtener las curvas de respuesta funcional frente a estos estados de desarrollo, se comprobó que cada uno de estos depredadores mostraba preferencias y eficiencias distintas en la depredación por

dichos estados de desarrollo. De este modo, *P. rufipes* fue la especie más eficaz depredando a *C. capitata* mientras que *F. auricularia* fue la que mostró parámetros de depredación más bajos. *Pseudoophonus rufipes* utilizó como presa preferencial el estado de pupa, con un índice de ataque y un tiempo de manejo estimados de 3,07 d<sup>-1</sup> y 0,048 d respectivamente, *P. cribata* utilizó los adultos recién emergidos, con un índice de ataque de 0,771 d<sup>-1</sup> y un tiempo de manejo de 0,051 d, mientras que *F. auricularia*, se mostró más eficiente depredando larvas de tercer estadio, con un índice de ataque de 0,296 d<sup>-1</sup> y un tiempo de manejo de 0,065 d.

Los resultados de eficiencia depredadora obtenidos en laboratorio no pueden ser extrapolados directamente a condiciones de campo. Por esta razón, se diseñaron dos marcadores moleculares específicos de *C. capitata* con los que fue posible detectar la presencia de su ADN, mediante PCR, en el tracto digestivo de especímenes de *P. cribata* y *P. rufipes* recogidos directamente de parcelas comerciales. Con este estudio se comprobó que en condiciones de campo tanto *P. cribata* como *P. rufipes* utilizaban como presa *C. capitata*, aunque el porcentaje de individuos que dieron positivo fue menor en *P. cribata* (5%) que en *P. rufipes* (23%). Como alternativa a las técnicas moleculares, también se han desarrollado anticuerpos específicos de *C. capitata*, que permitirán abordar una evaluación a gran escala de la actividad depredadora frente a esta plaga, del complejo de depredadores generalistas en cítricos. Por primera vez se han seleccionado varios anticuerpos recombinantes monoclonales altamente específicos frente a *C. capitata*. De hecho, con alguno de los anticuerpos seleccionados, mediante análisis ELISA, se obtuvo una señal hasta 7 veces más intensa con un extracto de proteína soluble de *C. capitata* que con otro de *Drosophila melanogaster*. Además, la lectura de absorbancia fue similar a la del control negativo con extractos de *P. cribata* y *Sesamia nonagrioides*. La eficiencia de estos anticuerpos deberá evaluarse más exhaustivamente, para así poder determinar su aplicabilidad en futuros estudios con este tipo de depredadores.

Dada la importancia que puede llegar a tener este conjunto de enemigos naturales en la gestión de *C. capitata*, sería necesario continuar profundizando en su conocimiento de manera que, en un futuro, puedan ser incluidos en las estrategias de conservación en el agroecosistema cítricos.

La mosca mediterrània de la fruita *Ceratitis capitata* (Wiedemann) és una de les plagues més importants de la fructicultura mundial. A Espanya, per la seua important repercussió econòmica, és considerada una de les plagues més greus dels cítrics. Tradicionalment, el control d'aquest fitòfag s'ha basat en la aplicació de tractaments químics. Tanmateix, la repercussió mediambiental dels pesticides, els seus efectes secundaris sobre la fauna útil del cultiu i la salut humana, i els elevats costos de cultiu que comporten, han suposat la recerca de noves alternatives per a la gestió d'aquesta plaga. Dins d'aquest context, el control biològic es mostra com una ferramenta encara sense explotar en aquesta plaga. Tant les larves de tercer estadi, com les pupes i els adults que acaben d'emergir es troben al sòl dels horts de cítrics. Per aquesta raó, en la present tesi s'ha estudiat en profunditat la importància dels depredadors polífags que habiten el sòl dels cítrics i la seua influència sobre *C. capitata*.

En primer lloc es va comprovar que el sòl de l'agroecosistema cítrics allotja un ric i abundant complex de depredadors polífags. De fet, en tres anys de mostratge es capturaren 17.526 espècimens adults d'artròpodes depredadors, agrupats en 110 espècies diferents. Els grups de major rellevància van ser l'ordre Araneae, amb 52 espècies trobades i el 29,2% de totes les captures, les famílies Staphylinidae i Carabidae de l'ordre Coleoptera, amb 34 i 19 espècies trobades i el 40% i 14,1% de totes les captures respectivament, i l'ordre Dermaptera, amb 4 espècies diferents i el 14,4% del total de captures. Tots els grups de depredadors, així com les espècies mes representatives de cadascun d'ells, mostraren uns patrons fenològics diferents, de manera que en qualsevol moment de l'any es va trobar activitat d'algun dels representants d'aquest complex. A més a més, es va observar una influència de la gestió de la coberta vegetal en l'abundància d'aquests depredadors. En les parcel·les on existia una coberta vegetal, espontània o cultivada, es va obtenir una major abundància de depredadors polífags.

Els tres depredadors més abundants, l'aranya *Pardosa cribata* Simon, el caràbid *Pseudoophonus rufipes* (De Geer) i el dermàpter *Forficula auricularia* L., depredaren en condicions de laboratori algun dels tres estats de desenvolupament de *C. capitata* que es troben al sòl. Després d'obtenir les corbes de resposta funcional per a aquests estats de desenvolupament, es va comprovar que cada depredador mostrava preferències i eficiències diferents en la depredació dels estats de desenvolupament esmentats. D'aquesta manera, *P. rufipes* va ser l'espècie mes

eficaç depredant *C. capitata*, mentre que *F. auricularia* va mostrar els paràmetres de depredació més baixos. *Pseudoophonus rufipes* va utilitzar com a presa preferencial l'estat de pupa, amb un índex d'atac i un temps de gestió estimats de 3,07 d<sup>-1</sup> i 0,048 d respectivament, *P. cribata* va utilitzar els adults que acaben d'emergir, amb un índex d'atac de 0,771 d<sup>-1</sup> i un temps de gestió de 0,051 d, mentre que *F. auricularia*, es va mostrar més eficient depredant larves de tercer estadi, amb un índex d'atac de 0,296 d<sup>-1</sup> i un temps de gestió de 0,065 d.

Els resultats d'eficiència depredadora obtinguts al laboratori no es poden extrapolar directament a les condicions de camp. Per aquesta raó, es van dissenyar dos marcadors moleculars específics de *C. capitata* amb els quals es va poder detectar la presència del seu DNA, mitjançant PCR, al tracte digestiu d'espècimens de *P. cribata* i *P. rufipes* recollits en parcel·les comercials. Gràcies a aquest estudi, es va comprovar que en condicions de camp *P. cribata* i *P. rufipes* utilitzaven com a presa *C. capitata*, encara que el percentatge d'individus que donaren positiu va ser menor amb *P. cribata* (5%) que amb *P. rufipes* (23%). Com a alternativa a les tècniques moleculars, també s'han desenvolupat anticossos específics de *C. capitata*, que permetran realitzar una avaluació a gran escala de l'activitat depredadora front a aquesta plaga, del complex de depredadors generalistes en cítrics. Per primera vegada s'han seleccionat alguns anticossos recombinants monoclonals altament específics front a *C. capitata*. De fet, amb algun d'aquests anticossos, mitjançant anàlisi ELISA, es va obtenir un senyal set vegades més intens amb un extracte de proteïna soluble de *C. capitata* que amb un altre de *Drosophila melanogaster* Meigen. A més a més, la lectura d'absorbància va ser similar a la del control negatiu en extractes de *P. cribata* i el noctuid *Sesamia nonagrioides* Lefebvre. L'eficiència d'aquests anticossos haurà de avaluar-se més exhaustivament, per a poder determinar la seua aplicabilitat en futurs estudis amb aquest tipus de depredadors.

Donada la importància que pot arribar a tenir aquest conjunt d'enemics naturals en la gestió de *C. capitata*, seria convenient continuar profunditzant en el seu coneixement de manera que, en un futur, puguin ser inclosos en les estratègies de conservació de l'agroecosistema cítrics.



The Mediterranean fruit fly (medfly) *Ceratitis capitata* (Wiedemann) is one of the most important agricultural pests worldwide and it is considered a major pest of citrus orchards in Spain due to huge fruit losses incurred and to quarantine restrictions. Current medfly control strategies in Spain have mainly been based on field monitoring and aerial and terrestrial treatments with insecticides. Chemical approaches affect both food quality and environment, and also have a negative impact on beneficials. In recent years, emphasis has been placed on implementing environmentally friendly methods to control medfly in Spain. Within this context, biological control measures have hardly been used. In medfly there are three developmental stages that are susceptible to being preyed upon by ground-dwelling predators: late third instars larvae, which jump from the fruit to pupate underground, pupae and teneral adults, which remain on the soil until they are able to fly. Therefore, this research has thoroughly studied the importance of these ground-dwelling predators in citrus groves and their influence upon *C. capitata*.

This work reveals the presence of a rich and abundant complex of ground-dwelling polyphagous predators inhabiting the ground surface of citrus orchards in eastern Spain. Indeed, in a three-year study 17,526 ground-dwelling predator specimens belonging to 110 different species were captured. The most important predatory groups found were: spiders (Araneae), with 29.2% of the captures and 52 species found, rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae), with 40% of the captures and 34 species, ground beetles (Coleoptera: Carabidae), with 14.1% of the captures and 19 species, and earwigs (Dermaptera) with 14.4% of the captures and 4 species. All these groups, as well as the most representative species belonging to them, showed different phenologies so that, on the whole, they were active throughout the year. On the other hand, there seems to be a relationship between their abundance and cover crop management. The existence of cover crops, either spontaneous or sown, resulted in greater ground-dwelling populations.

Under laboratory conditions, the three most abundant ground-dwelling predators found, *Pardosa cribata* Simon, *Pseudoophonus rufipes* (De Geer) and *Forficula auricularia* L. were able to prey on at least some of the three *C. capitata* developmental stages appearing on the citrus orchard floor. Functional responses of these predators were obtained when these developmental stages were offered as prey. *Pseudoophonus rufipes* was the most efficient predator, while *F. auricularia* was the least. *Pseudoophonus rufipes* preyed mainly upon pupae, with an estimated

attack rate of  $3.07\text{ d}^{-1}$  and a handling time of  $0.048\text{ d}$ , *P. cribata* used teneral adults as the main prey, with an estimate attack rate of  $0.771\text{ d}^{-1}$  and a handling time of  $0.051\text{ d}$ , and *F. auricularia* showed the highest preference for third-instar larvae, with an estimated attack rate of  $0.269\text{ d}^{-1}$  and a handling time of  $0.065\text{ d}$ .

Because predatory parameters obtained under laboratory conditions cannot be easily extrapolated to field conditions, polymerase chain reaction (PCR)-based techniques have been used as a means of detecting *C. capitata* DNA remains in *P. cribata* and *P. rufipes* specimens captured in a commercial citrus orchard. Both predators used *C. capitata* as prey under field conditions. The carabid *P. rufipes* turned out to be the most efficient predator, with 23% specimens testing positive, while the proportion of spiders testing positive was 5%. As an alternative to molecular approaches, *C. capitata* specific antibodies were developed. This method enables large-scale field studies to be performed in order to assess the incidence of predation of citrus ground-dwelling predators upon the medfly. This is the first time that monoclonal phage-display antibodies have been selected for use in post-mortem analysis using *C. capitata* as target prey. When testing by ELISA analysis, some of these selected monoclonal antibodies showed specificity seven times higher with *C. capitata* than with *D. melanogaster* soluble protein extracts. Besides, these antibodies did not show cross-reactivity with *P. cribata* and the noctuid *Sesamia nonagroides* Lefebvre soluble protein extracts. Further studies on their efficiency will be needed to know their applicability in large-scale studies.

According to our results, ground-dwelling predators could play an important role on regulating *C. capitata* populations. A challenge for the future will be how to enhance their populations, to increase their efficiency against this pest, and consequently, to incorporate them in current citrus conservation biological control strategies.

# Índices



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1</b>	<b>Introducción general.....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Control de plagas en cítricos.....</b>	<b>3</b>
1.1.1	Importancia de los cítricos.....	3
1.1.2	Plagas en cítricos, importancia y jerarquización en función de su gestión.....	3
1.1.3	Control biológico de plagas en cítricos.....	6
1.2	<b><i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae).....</b>	<b>7</b>
1.2.1	Clasificación taxonómica.....	7
1.2.2	Descripción.....	7
1.2.3	Origen y distribución geográfica.....	8
1.2.4	Ciclo biológico y ecología.....	10
1.2.5	Daños e importancia económica.....	11
1.2.6	Métodos de control.....	12
1.2.6.1	Control químico.....	12
1.2.6.2	Medidas culturales.....	13
1.2.6.3	Trampeo masivo.....	13
1.2.6.4	Quimioesterilización.....	14
1.2.6.5	Control autocida.....	14
1.2.6.6	Control biológico.....	15
1.3	<b>Objetivos.....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>Identificación del complejo de depredadores polífagos presentes en el suelo de cítricos.....</b>	<b>21</b>
2.1	<b>Introducción.....</b>	<b>23</b>
2.2	<b>Material y métodos.....</b>	<b>28</b>
2.2.1	Diseño experimental.....	28
2.2.2	Análisis de datos.....	30
2.2.2.1	Patrones de actividad-densidad.....	30
2.2.2.2	Indicadores de estructura poblacional.....	31
2.2.2.3	Estimación de la riqueza de especies.....	31
2.3	<b>Resultados.....</b>	<b>33</b>
2.3.1	Artrópodos depredadores.....	33

2.3.2	Arañas .....	34
2.3.2.1	Composición de especies y abundancia relativa .....	34
2.3.2.2	Patrones de actividad-densidad.....	34
2.3.2.3	Indicadores de estructura poblacional .....	39
2.3.2.4	Estimación de la riqueza de especies .....	40
2.3.3	Estafilínidos .....	43
2.3.3.1	Composición de especies y abundancia relativa .....	43
2.3.3.2	Patrones de actividad-densidad.....	44
2.3.3.3	Indicadores de estructura poblacional .....	48
2.3.3.4	Estimación de la riqueza de especies .....	50
2.3.4	Carábidos .....	52
2.3.4.1	Composición de especies y abundancia relativa .....	52
2.3.4.2	Patrones de actividad-densidad.....	53
2.3.4.3	Estimación de la riqueza de especies .....	56
2.3.5	Dermápteros .....	58
2.3.5.1	Composición de especies y abundancia relativa .....	58
2.3.5.2	Patrones de actividad-densidad.....	59
2.3.6	Cicindélidos .....	62
2.3.6.1	Composición de especies y abundancia relativa .....	62
2.3.6.2	Patrones de actividad-densidad.....	62
2.4	Discusión .....	67

### 3 Evaluación de la capacidad depredadora de las especies más representativas de depredadores frente a *Ceratitis*

<i>capitata</i> .....	75
3.1 <b>Introducción</b> .....	77
3.2 <b>Material y métodos</b> .....	83
3.2.1      Ensayos de preferencia .....	84
3.2.2      Respuesta funcional .....	84
3.2.3      Análisis de datos.....	86
3.3 <b>Resultados</b> .....	88
3.3.1 <i>Pardosa cribata</i> .....	88
3.3.1.1      Ensayos de preferencia .....	88
3.3.1.2      Respuesta funcional .....	89

3.3.2	<i>Pseudoophonus rufipes</i> .....	90
3.3.2.1	Respuesta funcional.....	90
3.3.3	<i>Forficula auricularia</i> .....	91
3.3.3.1	Respuesta funcional.....	91
3.4	<b>Discusión</b> .....	92
4	<b>Detección de depredación de <i>Ceratitis capitata</i> por marcadores moleculares</b> .....	97
4.1	<b>Introducción</b> .....	99
4.2	<b>Material y métodos</b> .....	103
4.2.1	Puesta a punto del método.....	103
4.2.1.1	Artrópodos.....	103
4.2.1.2	Diseño de los cebadores .....	103
4.2.1.3	Condiciones de amplificación .....	104
4.2.1.4	Extracción del ADN .....	106
4.2.1.5	Pruebas de reactividad cruzada y sensibilidad.....	107
4.2.2	Detección de la depredación de <i>Ceratitis capitata</i> por <i>Pardosa cribata</i> y <i>Pseudoophonus rufipes</i> .....	107
4.2.2.1	Curvas de degradación y tiempos de detección 50 .....	107
4.2.2.1.1	<i>Pardosa cribata</i> .....	107
4.2.2.1.2	<i>Pseudoophonus rufipes</i> .....	109
4.2.2.2	Detección en campo.....	109
4.2.2.2.1	<i>Pardosa cribata</i> .....	109
4.2.2.2.2	<i>Pseudoophonus rufipes</i> .....	111
4.3	<b>Resultados</b> .....	112
4.3.1	Diseño de los marcadores y test de reactividad cruzada .....	112
4.3.2	Tiempos de detección .....	114
4.3.2.1	<i>Pardosa cribata</i> .....	114
4.3.2.2	<i>Pseudoophonus rufipes</i> .....	114
4.3.3	Ensayo de campo.....	116
4.3.3.1	<i>Pardosa cribata</i> .....	116
4.3.3.2	<i>Pseudoophonus rufipes</i> .....	116
4.4	<b>Discusión</b> .....	119

<b>5</b>	<b>Detección de depredación de <i>Ceratitis capitata</i> por técnicas inmunológicas .....</b>	<b>125</b>
5.1	Introducción.....	127
5.1.1	Estructura de los anticuerpos .....	127
5.1.2	Tipos de anticuerpos y su aplicación para los ensayos de detección de presas.....	129
5.1.2.1	Anticuerpos policlonales .....	129
5.1.2.2	Anticuerpos monoclonales.....	130
5.1.2.3	Anticuerpos recombinantes de expresión en fagos (Phage display).....	130
5.2	Material y métodos.....	136
5.2.1	Preparación de los extractos antigénicos .....	136
5.2.2	Obtención de anticuerpos policlonales .....	137
5.2.3	ELISA indirecto en placa .....	138
5.2.4	Obtención de anticuerpos recombinantes .....	139
5.2.4.1	Propagación de la genoteca .....	139
5.2.4.2	Obtención de un stock secundario de las genotecas.....	142
5.2.4.3	Enriquecimiento y selección de clones (biopanning) .....	142
5.2.4.4	Selección de clones. Evaluación de su especificidad y sensibilidad.....	144
5.2.4.5	Secuenciación, alineamiento y comparación de las regiones $V_H$ y $V_k$ de los clones seleccionados .....	145
5.3	Resultados .....	147
5.3.1	Anticuerpos policlonales de conejo .....	147
5.3.2	Anticuerpos monoclonales recombinantes .....	148
5.3.2.1	Selección de clones.....	148
5.3.2.2	Secuenciación, alineamiento y comparación de las regiones $V_H$ y $V_k$ de los clones seleccionados .....	150
5.5	Discusión .....	153
<b>6</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>157</b>
<b>7</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>161</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>1</b>	<b>Introducción general -----</b>	<b>1</b>
1.1	Hembra adulta de <i>C. capitata</i> mostrando el oviscapto (flecha).-----	8
1.2	Macho adulto de <i>C. capitata</i> mostrando las quetas cefálicas (flechas).-----	8
1.3	Mapa de distribución mundial de <i>C. capitata</i> (Fuente: EPPO, 2006). -----	9
1.4	Estados de desarrollo biológico de <i>C. capitata</i> que se dan en el suelo de cítricos: <b>A)</b> Larvas de 3º estadio, <b>B)</b> estado de pupa, <b>C)</b> adulto recién emergido, con las alas sin desplegar y <b>D)</b> adulto con las alas parcialmente desplegadas. -----	16
<b>2</b>	<b>Identificación del complejo de depredadores polífagos presentes en el suelo de cítricos.-----</b>	<b>21</b>
2.1	Situación geográfica de las parcelas muestreadas: <b>A)</b> Olocau, <b>B)</b> Náquera, <b>C)</b> Bétera. -----	27
2.2	Componentes y proceso de instalación de una trampa de gravedad. -----	30
2.3	Composición de la abundancia relativa <b>A)</b> y riqueza específica <b>B)</b> de los distintos grupos de depredadores polífagos encontrados en suelos de cítricos tras tres años de muestreos con trampas de gravedad en tres parcelas de cítricos de la provincia de Valencia. -----	33
2.4	Promedio de adultos de araña capturados por trampa, para cada estación, en cada uno de los tres años del estudio y en las tres parcelas muestreadas: <b>A)</b> Bétera, <b>B)</b> Olocau y <b>C)</b> Náquera. -----	36
2.5	Número medio de especímenes de <i>P. cribata</i> (individuos/trampa y día $\pm$ ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en tres huertos de cítricos sometidos a diferente manejo de la cubierta vegetal: <b>A)</b> Bétera (cubierta espontánea), <b>B)</b> Olocau (cubierta monoespecífica de <i>F. arundinacea</i> ) y <b>C)</b> Náquera (suelo desnudo). Las estaciones climáticas han sido diferenciadas y marcadas (Oñ: Otoño, Inv: Invierno, Prm: Primavera, Ver: Verano). -----	37
2.6	Número medio de especímenes de <i>Zodariion</i> sp. (individuos/trampa y día $\pm$ ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en la parcela de Bétera (cubierta espontánea). -----	38
2.7	Número medio de especímenes de <i>T. fuscipes</i> (individuos/trampa y día $\pm$ ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de	

	tres años en la parcela de Olocau (cubierta monoespecífica de <i>F. arundinacea</i> ).-----	38
2.8	Número medio de especímenes de <i>A. perita</i> (individuos/trampa y día $\pm$ ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en la parcela de Bétera (cubierta espontánea). -----	38
2.9	Distribuciones de abundancia de arañas en las tres parcelas muestreadas: <b>A)</b> Bétera, <b>B)</b> Olocau, <b>C)</b> Náquera. Los datos de abundancia se han dividido en octavas utilizando una escala log3 y con límites superior de cada clase 1,5; 3,5; 9,5;... respectivamente. -----	39
2.10	Valores promedios estimados de la riqueza de especies en las tres parcelas muestreadas, utilizando los índices ACE, ICE y Chao1,Chao2, Jackknife1 y Jackknife2 para cada incremento de muestras en el análisis y con 50 reordenaciones aleatorias del orden de entrada de éstas.-----	41
2.11	Promedio de adultos de estafilínidos capturados por trampa, para cada estación, en cada uno de los tres años del estudio y en las tres parcelas muestreadas: <b>A)</b> Bétera, <b>B)</b> Olocau y <b>C)</b> Náquera. -----	41
2.12	Número medio de especímenes de <i>A. mucronata</i> (individuos/trampa y día $\pm$ ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en las parcelas de <b>A)</b> Olocau (cubierta monoespecífica de <i>F. arundinacea</i> ) y <b>B)</b> Bétera (cubierta espontánea). Las estaciones climáticas han sido diferenciadas y marcadas (Oñ: Otoño, Inv: Invierno, Prm: Primavera, Ver: Verano). -----	46
2.13	Número medio de especímenes de <i>A. inustus</i> (individuos/trampa y día $\pm$ ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en <b>A)</b> Olocau (cubierta monoespecífica de <i>F. arundinacea</i> ) y <b>B)</b> Náquera (suelo desnudo).-----	47
2.14	Número medio de especímenes de <i>O. olens</i> (individuos/trampa y día $\pm$ ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en <b>A)</b> Bétera (cubierta espontánea) y <b>B)</b> Náquera (suelo desnudo).-----	48
2.15	Distribuciones de abundancia de estafilínidos en las tres parcelas muestreadas: <b>A)</b> Bétera, <b>B)</b> Olocau, <b>C)</b> Náquera. Los datos de abundancia se han dividido en octavas utilizando una escala log3 y con límites superior de cada clase 1,5; 3,5; 9,5;... respectivamente. -----	49

2.16	Valores promedios estimados de la riqueza de especies en las tres parcelas muestreadas, utilizando los índices ACE, ICE, Chao1 y Chao2 para cada incremento de muestras en el análisis y con 50 reordenaciones aleatorias del orden de entrada de éstas. -----	51
2.17	Promedio de adultos de carábidos capturados por trampa, para cada estación, en cada uno de los tres años del estudio y en las tres parcelas muestreadas: <b>A)</b> Bétera, <b>B)</b> Olocau, <b>C)</b> Náquera. -----	54
2.18	Número medio de especímenes (individuos/trampa y día $\pm$ ES) de <b>A)</b> <i>P. rufipes</i> , <b>B)</b> <i>H. distinguendus</i> y <b>C)</b> <i>A. aenea</i> , recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en la parcela de Bétera (cubierta espontánea). Las estaciones climáticas han sido diferenciadas y marcadas (Oñ: Otoño, Inv: Invierno, Prm: Primavera, Ver: Verano).-----	55
2.19	Valores promedios estimados de la riqueza de especies en las tres parcelas muestreadas, utilizando los índices ACE, ICE, Chao1, MM y Jackknife2 para cada incremento de muestras en el análisis y con 50 reordenaciones aleatorias del orden de entrada de éstas. -----	57
2.20	Promedio de adultos de dermápteros capturados por trampa, para cada estación, en cada uno de los tres años del estudio y en las tres parcelas muestreadas: <b>A)</b> Bétera, <b>B)</b> Olocau y <b>C)</b> Náquera.-----	60
2.21	Número medio de especímenes <i>E. moesta</i> (individuos/trampa y día $\pm$ ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en la parcela de Olocau (cubierta monoespecífica de <i>F. arundinacea</i> ). Las estaciones climáticas han sido diferenciadas y marcadas (Oñ: Otoño, Inv: Invierno, Prm: Primavera, Ver: Verano). -----	61
2.22	Número medio de especímenes <i>F. auricularia</i> (individuos/trampa y día $\pm$ ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en la parcela de Bétera (cubierta espontánea). -----	61
2.23	Número medio de especímenes <i>E. annulipes</i> (individuos/trampa y día $\pm$ ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en la parcela de Olocau (cubierta monoespecífica de <i>F. arundinacea</i> ).-----	61
2.24	Promedio de adultos de cicindélidos capturados por trampa, para cada estación, en cada uno de los tres años del estudio y en las tres parcelas muestreadas: <b>A)</b> Bétera, <b>B)</b> Olocau, <b>C)</b> Náquera. -----	63

2.25	Número medio de especímenes <i>C. campestris</i> (individuos/trampa y día $\pm$ ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en la parcela de Olocau (cubierta monoespecífica de <i>F. arundinacea</i> ). Las estaciones climáticas han sido diferenciadas y marcadas (Oñ: Otoño, Inv: Invierno, Prm: Primavera, Ver: Verano).-----	63
2.26	Número medio de especímenes <i>C. lagunensis</i> (individuos/trampa y día $\pm$ ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en la parcela Bétera (cubierta espontánea).-----	64
2.27	Especies de arañas con mayor frecuencia de capturas en suelos de cítricos mediante trampas de gravedad. <b>A)</b> <i>Pardosa cribata</i> Simon, <b>B)</b> <i>Zodariion sp.</i> , <b>C)</b> <i>Trachyzelotes fuscipes</i> (L. Koch) y <b>D)</b> <i>Arctosa perita</i> (Latreille).-----	64
2.28	Especies de estafilínidos de elevada frecuencia de capturas durante este estudio en suelos de cítricos mediante trampas de gravedad. <b>A)</b> <i>Anotylus inustus</i> (Gravenhorst), <b>B)</b> <i>Atheta (Xenota) mucronata</i> Kraatz, <b>C)</b> <i>Platystethus cornutus</i> Gravenhorst y <b>D)</b> <i>Ocyopus olens</i> (Müller).-----	65
2.29	Especies de carábidos con mayor frecuencia de capturas en suelos de cítricos mediante trampas de gravedad. <b>A)</b> <i>Pseudoophonus (Pseudoophonus) rufipes</i> (De Geer), <b>B)</b> <i>Amara aenea</i> De Geer <b>C)</b> <i>Harpalus (Harpalus) distinguendus</i> (Duftschmid).-----	65
2.30	Especies de dermápteros presentes en suelos de cítricos. <b>A)</b> <i>Forficula auricularia</i> L., <b>B)</b> <i>Euborelia annulipes</i> (Dohrn), <b>C)</b> <i>Euborellia moesta</i> (Gené) y <b>D)</b> <i>Labidura riparia</i> (Pallas).-----	66
2.31	Especies de cicindélidos presentes en suelos de cítricos. <b>A)</b> <i>Cicindela (Cicindela) campestris</i> L. y <b>B)</b> <i>Cicindela (Cicindela) lagunensis</i> Gautier des Cottés.-----	66
<b>3</b>	<b>Evaluación de la capacidad depredadora de las especies más representativas de depredadores frente a <i>C. capitata</i>.</b> -----	<b>75</b>
3.1	Representación gráfica de los tipos de respuesta funcional teóricos más frecuentes: <b>A)</b> Respuesta tipo I, <b>B)</b> Respuesta tipo II, <b>C)</b> Respuesta tipo III.-----	81
3.2	Unidad experimental utilizada para la evaluación de la respuesta funcional. <b>B)</b> Suministro de alimento para los adultos de <i>C. capitata</i> dentro de la unidad de ensayo. <b>C)</b> Síntomas de depredación en pupas causados por el carábido <i>P. rufipes</i> .-----	86

3.3	Depredación media ( $X \pm ES$ ) por día de larvas, pupas y adultos de <i>C. capitata</i> por <i>P. cribata</i> en un ensayo sin elección. A cada araña se le ofrecieron 5 presas. Dentro de cada tratamiento, letras mayúsculas diferentes implican diferencias significativas entre presas depredadas y consumidas. Entre tratamientos, letras minúsculas diferentes implican diferencias significativas entre presas depredadas o entre presas consumidas (LSD, $P < 0.05$ ). -----	88
3.4	Número de presas muertas ( $X \pm ES$ ) a las diferentes densidades de presa para <i>P. cribata</i> frente a adultos de <i>C. capitata</i> , <i>P. rufipes</i> frente a pupas, larvas y adultos, y <i>F. auricularia</i> frente a larvas, y sus correspondientes curvas de respuesta funcional (tipo II) por ajuste no lineal de mínimos cuadrados.-----	90
<b>4</b>	<b>Detección de depredación de <i>C. capitata</i> por marcadores moleculares. -----</b>	<b>97</b>
4.1	Extracción del tracto digestivo de <i>P. rufipes</i> después de ser alimentado con una pupa de <i>C. capitata</i> .-----	106
4.2	Ensayo de obtención de curvas de degradación del ADN de la presa. <b>A)</b> Botes de plástico en los que se le ofrece la presa al depredador, <b>B)</b> Lotes realizados para congelar a los distintos tiempos de digestión y <b>C)</b> <i>P. cribata</i> alimentándose de un adulto de <i>C. capitata</i> (fase de predigestión e ingestión). -----	108
4.3	Parcela de Bétera en la que se realizaron los ensayos de detección de depredación en campo con <i>P. cribata</i> y <i>P. rufipes</i> .-----	110
4.4	Patrón de amplificación de los dos pares de cebadores ITS específicos frente a <i>C. capitata</i> y del par de cebadores control 18SrADN al ser probados frente a diferentes artrópodos. <b>A)</b> Amplificación específica del CcITS1-2. <b>B)</b> Amplificación específica del CcITS1-737. <b>C)</b> Amplificación control con 18SrADN; <b>M</b> corresponde a la escalera de marcadores de 100 pb; <b>c-</b> corresponde al control negativo de la PCR; las muestras <b>1-32</b> se corresponden a las especies citadas en la <b>Tabla 4.1</b> , cuyos códigos respectivos son (Pc, Fru, Mba, Fau, Emo, Cca, Psr, Cmo, Tur, Mpe, Ago, Asp, Asu, Bol, Btr, Bne, Bmu, Bfr, Cro, Cc y Ccv8). Los ADN de la especie <i>C. capitata</i> y el control negativo han sido destacados sobre los demás. -----	113
4.5	Test de sensibilidad de los dos pares de cebadores CcITS ("1-2" y "737") con diluciones seriadas de ADN de <i>C. capitata</i> ; <b>M</b> corresponde	

	a la escalera de marcadores de 100 pb; <b>c-</b> corresponde al control negativo de la PCR. -----	113
4.6	Curvas de probabilidad de detección de ADN de <i>C. capitata</i> en <i>P. cribata</i> para los diferentes tiempos de digestión. Las líneas indican el ajuste al modelo probit con sus intervalos de confianza 95%. Los triángulos negros y las líneas continuas corresponden al par de cebadores CcITS1-2 mientras que los triángulos blancos y líneas discontinuas corresponden al CcITS1-737. -----	115
4.7	Curva de probabilidad de detección de ADN de <i>C. capitata</i> en <i>P. rufipes</i> para los diferentes tiempos de digestión utilizando el par de cebadores CcITS1-737. Las líneas indican el ajuste al modelo probit con sus intervalos de confianza 95%. -----	115
4.8	Porcentaje de arañas que dieron positivo en el ensayo de campo con el par de cebadores CcITS1-737, y promedio ( $\pm$ ES) del número de adultos estériles capturados por trampa y día (MTD). -----	116
4.9	Amplificaciones positivas de <i>C. capitata</i> con el marcador CcITS737 sobre el contenido del tracto digestivo de 36 especímenes de <i>P. rufipes</i> capturados en una parcela comercial de clementinos tras una infestación artificial con pupas de <i>C. capitata</i> . Los carábidos fueron capturados 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 8 días después de la infestación. Cada muestra está etiquetada con el día de captura y número de espécimen. Se utilizó la escalera de marcadores de 100 pb; C-i, controles negativos de la PCR; *las muestras 1.8 and 7.1 se analizaron a dos concentraciones diferentes de ADN. En blanco se encuadran aquellas muestras consideradas como detección positiva. <b>A) PCR1, B) PCR2, C) PCR3 y D) PCR4.</b> -----	117
<b>5</b>	<b>Detección de depredación de <i>C. capitata</i> por técnicas inmunológicas.</b> -----	<b>125</b>
5.1	Estructura básica de una molécula de anticuerpo. -----	128
5.2	Localización de las regiones hipervariables (CDRs) dentro del dominio variable (Fv) de cada cadena. La variabilidad en secuencias de aminoácidos y longitud de estas regiones es la máxima responsable de la gran diversidad en afinidades de los anticuerpos. -----	129
5.3	Tipos de fragmentos de anticuerpos recombinantes obtenidos mediante la tecnología Phage display. <b>A)</b> Fragmentos (Fab) <sub>2</sub> , formados por todos los dominios variables del anticuerpo, los dominios constantes de las dos cadenas ligeras y los CH <sub>1</sub> de ambas	

	cadenas pesadas. <b>B)</b> Fragmentos Fab, compuestos por 2 dominios variables y dos constantes, <b>C)</b> Fragmentos scFv (single-chain Fragment variable), fusión de dos regiones variables de las cadenas ligera y pesada mediante uniones de serina-glicinas.-----	131
5.4	Mapa y características del vector plasmídico pIT2 utilizado en las genotecas de fagos recombinantes usadas en este trabajo. <b>Promotor lac</b> , promotor del sistema de selección de plásmidos a partir del metabolismo de la lactosa; <b>RBS</b> : sitio de unión del ribosoma para el inicio de la traducción; <b>pelB guía</b> : secuencia traducida de aa encargada de transportar la proteína a la que está unida a la membrana de <i>E. coli</i> para construir la cápsula del bacteriófago; <b>Insertos V<sub>H</sub> y V<sub>K</sub></b> : insertos recombinantes de las regiones variables de inmunoglobulinas de humanos; <b>linker</b> : secuencia peptídica que hace de unión entre ambos insertos; <b>myctag</b> : secuencia de reconocimiento por anticuerpos, altamente inmuno-reactiva; <b>ámbar</b> : codon de parada en la traducción (UAG); <b>gIII</b> : gen de la proteína de cubierta pIII; <b>M13 ori</b> : origen de replicación del fago M13; <b>amp</b> : gen de resistencia a ampicilina; <b>colE1 ori</b> : origen de replicación del plásmido E1 de <i>E. coli</i> ; y <b>SfiI/NocI, XhoI, SalI, NotI</b> : enzimas de restricción que delimitan los insertos. -----	134
5.5	Patrón de bandas de los extractos de proteína soluble de <i>C. capitata</i> (Cc) y <i>D. melanogaster</i> (Dmel). -----	136
5.6	Proceso de propagación de una genoteca de anticuerpos recombinantes y obtención de fagos que expresan el anticuerpo (fagemización de la genoteca).-----	141
5.7	Proceso de selección y propagación de fagos (biopanning). -----	143
5.8	Lecturas de absorbancia a 492 nm de los distintos sueros monoclonales de anticuerpos recombinantes seleccionados, al enfrentarlos a extractos de proteína soluble (10 µg/ml) de 4 especies de artrópodos de importancia agrícola ( <i>C. capitata</i> , <i>D. melanogaster</i> , <i>S. nonagrioides</i> y <i>P. cribata</i> ) y un control negativo, y del suero policlonal de conejo (dilución 1:1000) con extractos de proteína soluble (10 µg/ml) de <i>C. capitata</i> y <i>D. melanogaster</i> . -----	149
5.9	Lecturas de absorbancia a 492 nm del suero policlonal de conejo (dilución 1:1.000) y del clon J2 al enfrentarlos a distintas concentraciones de proteína soluble de <i>C. capitata</i> (10, 1, 0,1 µg/ml para el suero policlonal, y 10, 5, 1, 0,1 µg/ml para el suero monoclonal).-----	149

- 5.10 Alineamiento de las secuencias del inserto  $V_H$  de los clones seleccionados. Color negro indica que no existen diferencias. Grises más claros indican más diferencias entre los nucleótidos de una misma posición de los distintos clones. ----- 151
- 5.11 Alineamiento de las secuencias del inserto  $V_k$  de los clones seleccionados. Color negro indica que no existen diferencias. Los 25 y 26 primeros nucleótidos de los clones J64 y J65 no aparecen por errores de secuenciación en el inicio de las secuencias.----- 152



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>1</b>	<b>Introducción general -----</b>	<b>1</b>
1.1	Especies fitófagas con potencial de alcanzar el nivel de plaga en cítricos, agrupadas según su grado de control biológico, y sus principales enemigos naturales.-----	5
<b>2</b>	<b>Identificación del complejo de depredadores polífagos presentes en el suelo de cítricos.-----</b>	<b>21</b>
2.1	Número total de arañas del suelo capturadas con trampas de gravedad en tres parcelas de cítricos de la provincia de Valencia durante tres años de muestreos.-----	35
2.2	Valores de <i>P</i> del análisis de comparación por pares de datos entre estaciones (T1: invierno; T2: primavera; T3: verano; T4: otoño) del número de arañas recogidas por trampa (Modelo lineal mixto generalizado con medidas repetidas). Las áreas sombreadas corresponden a diferencias estadísticas en el análisis. -----	36
2.3	Test estadístico de Kolmogorov-Smirnov para el ajuste de los datos de abundancia de los tres grupos de arañas muestreados a los modelos teóricos de distribución: log-normal, series logarítmicas y series geométricas. -----	39
2.4	Riqueza en especies de arañas estimada en las tres parcelas muestreadas. En algunos índices también se ha representado la desviación estándar (DS) o los intervalos de confianza (IC). -----	43
2.5	Número total de estafilínidos capturados con trampas de gravedad en tres parcelas de cítricos de la provincia de Valencia durante tres años de muestreos. -----	44
2.6	Valores de <i>P</i> del análisis de comparación por pares de datos entre estaciones (T1: invierno; T2: primavera; T3: verano; T4: otoño) del número de estafilínidos por trampa (Modelo lineal mixto generalizado con medidas repetidas). Las áreas sombreadas corresponden a diferencias estadísticas en el análisis. -----	45
2.7	Test estadístico de Kolmogorov-Smirnov para el ajuste de los datos de abundancia de los tres grupos de estafilínidos muestreados a los modelos teóricos de distribución: log-normal, series logarítmicas y series geométricas.-----	49

2.8	Riqueza en especies de estafilínidos estimada en las tres parcelas muestreadas. En los índices Chao1 y Chao2 también se han mostrado los intervalos de confianza (IC). -----	50
2.9	Número total de carábidos capturados con trampas de gravedad en tres parcelas de cítricos de la provincia de Valencia durante tres años de muestreos. -----	53
2.10	Valores de <i>P</i> del análisis de comparación por pares de datos entre estaciones (T1: invierno; T2: primavera; T3: verano; T4: otoño) del número de carábidos por trampa (Modelo lineal mixto generalizado con medidas repetidas). Las áreas sombreadas corresponden a diferencias estadísticas en el análisis. Los datos de la estación T1 de Náquera han sido excluidos del análisis ya que T1-año 2 y T1-año 3 no presentaron capturas y por lo tanto no existía variabilidad en estas combinaciones. -----	54
2.11	Riqueza en especies de carábidos estimada en las tres parcelas muestreadas. En el índice Chao1 se han representado los intervalos de confianza (IC). -----	56
2.12	Número total de dermápteros capturados con trampas de gravedad en tres parcelas de cítricos de la provincia de Valencia durante tres años de muestreos. -----	59
2.13	Valores de <i>P</i> del análisis de comparación por pares de datos entre estaciones (T1: invierno; T2: primavera; T3: verano; T4: otoño) del número de dermápteros por trampa (Modelo lineal mixto generalizado con medidas repetidas). Las áreas sombreadas corresponden a diferencias estadísticas en el análisis. -----	60
2.14	Número total de cicindélidos capturados con trampas de gravedad en tres parcelas de cítricos de la provincia de Valencia durante tres años de muestreos. -----	62
<b>3</b>	<b>Evaluación de la capacidad depredadora de las especies más representativas de depredadores frente a <i>C. capitata</i>. -----</b>	<b>75</b>
3.1	Adultos de <i>Ceratitis capitata</i> muertos y consumidos ( $X \pm ES$ ) por <i>P. cribata</i> a diferentes densidades de presa. -----	89
3.2	Índices de ataque y tiempos de manejo estimados para <i>P. cribata</i> , <i>P. rufipes</i> y <i>F. auricularia</i> , ensayados frente a los diferentes estados de <i>C. capitata</i> que pueden aparecer en el suelo, tras el ajuste a sus correspondientes curvas de respuesta funcional. -----	91

<b>4</b>	<b>Detección de depredación de <i>C. capitata</i> por marcadores moleculares.</b>	<b>97</b>
4.1	Especies de artrópodos utilizadas para la evaluación de los cebadores diseñados específicos frente a <i>C. capitata</i> . Las especies han sido clasificadas en depredadores y fitófagos, incluyendo el orden y la familia al que pertenecen así como la localidad y el país en el que fueron muestreadas. A cada una de ellas se la ha asignado un código de identificación.	105
4.2	Secuencias de los cebadores (5'-3') y condiciones de la PCR.	106
<b>5</b>	<b>Detección de depredación de <i>C. capitata</i> por técnicas inmunológicas.</b>	<b>125</b>
5.1	Lecturas de absorbancia a 492 nm (promedio $\pm$ error estándar) obtenidas mediante ELISA indirecto al enfrentar diferentes diluciones del suero policlonal de conejo con distintas concentraciones de extractos de proteína soluble de <i>C. capitata</i> (Cc) y <i>D. melanogaster</i> (Dmel).	147



# 1 Introducción general





## **1.1 Control de plagas en cítricos**

### **1.1.1 Importancia de los cítricos**

El sector cítrícola es uno de los más importantes dentro de la agricultura española. Con 6.862.635 t producidas en 2006 (MARM 2007), España fue el quinto país productor mundial de cítricos. El 48% de toda la producción cítrícola va dedicada a la exportación. De hecho, nuestro país es el primer exportador de cítricos a nivel mundial (FAO 2006). La producción cítrícola española está valorada en aproximadamente 1.200 millones de euros anuales, suponiendo esto el 5% de todo el valor conseguido por el sector agrario (MARM 2007).

La producción cítrícola española está dedicada principalmente al consumo en fresco (86% de toda la producción) (FAO 2006). Por grupos, la naranja dulce (con un 49,5% de la producción total), las mandarinas (36,5%) y el limón (12,8%), son los de mayor peso en el sector.

La Comunidad Valenciana es el principal productor de cítricos de España con un 62,8% del total de la producción. Esta Comunidad Autónoma es la mayor productora de naranja dulce y clementina, con el 56,5% y el 81,8% de la producción respectivamente, y es la segunda en producción de limones (MARM 2007). Además, esta región es la principal exportadora tanto de naranja dulce como de clementinas (77,3% y 90,0% respectivamente del total de las exportaciones en 2006).

### **1.1.2 Plagas en cítricos, importancia y jerarquización en función de su gestión**

Debido al elevado porcentaje de la producción cítrícola española dedicado al consumo en fresco, la gestión de plagas es de especial importancia en este cultivo, ya que el producto final ha de presentar unos estándares de calidad no exigibles a la producción dirigida a la transformación. Actualmente, la gestión de plagas en cítricos está basada en la combinación de diferentes estrategias que tienen como finalidad minimizar la aplicación de tratamientos químicos (Gestión Integrada de Plagas, GIP). Entre las diferentes estrategias utilizadas, el control biológico ocupa un lugar prioritario. Esto es debido principalmente a que el agrosistema cítricos alberga a un rico y equilibrado complejo de fitófagos y enemigos naturales. Así, en los cítricos

españoles se han citado más de 100 especies de artrópodos fitófagos, de las cuales la gran mayoría están sometidas a un control eficiente por sus enemigos naturales y tan sólo una quinta parte de éstas puede alcanzar en determinadas circunstancias la categoría de plaga (Urbaneja et al. 2009a). La gestión de aquellos fitófagos potencialmente plaga deberá tener en cuenta al resto de enemigos naturales del agrosistema para evitar la aparición de futuros desequilibrios. Según el grado de control al que están sometidos estos fitófagos pueden dividirse en las siguientes categorías (**Tabla 1.1**):

- *Fitófagos secundarios*: Aquellas especies que presentan un control biológico excelente y salvo perturbaciones importantes en el sistema, no van a llegar al umbral económico de daños. La conservación de sus enemigos naturales se considera prioritaria en cualquier estrategia de control de plagas.
- *Plagas ocasionales*: Aquellos fitófagos con un control biológico generalmente satisfactorio pero que ocasionalmente escapan al control ejercido por sus enemigos naturales, alcanzado entonces el umbral económico de daños. La conservación de sus enemigos naturales también es considerada esencial, aunque cuando se da un control biológico insuficiente, éste ha de ser apoyado con otro tipo de acciones que deberán ser lo más respetuosas posibles con estos enemigos naturales así como con los de los fitófagos secundarios.
- *Plagas clave*: En este grupo se engloba a todas aquellas especies de fitófagos que presentan un control biológico insatisfactorio y que por consiguiente, sus niveles poblacionales alcanzan con frecuencia el umbral económico de daños. El control de este grupo de fitófagos tradicionalmente se ha fundamentado en la aplicación de plaguicidas, entrando por lo tanto su manejo en conflicto con el de otras especies fitófagas al alterarse los equilibrios enemigo natural-fitófago preexistentes. Por esta razón, en los últimos años se ha puesto un especial énfasis en la búsqueda de nuevos métodos de control de este grupo de plagas que sean compatibles con el control biológico del resto de fitófagos. Un ejemplo de fitófago perteneciente a esta categoría es la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae).



Categoría	Fitófago	Enemigos naturales
Fitófagos secundarios:	<i>Icerya purchasi</i> Maskell (Hemiptera: Margarodidae)	<i>Rodolia cardinalis</i> (Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae)
	<i>Insulaspis gloverii</i> (Packard) (Hemiptera: Diaspididae)	<i>Encarsia herndoni</i> (Girault) (Hymenoptera: Aphelinidae)
	<i>Coccus hesperidum</i> L. y <i>Coccus pseudomagnoliarum</i> (Kuwana) (Hemiptera: Coccidae)	<i>Metaphycus helvolus</i> (Compere), <i>Metaphycus flavus</i> (Howard) y <i>Metaphycus lounsburyi</i> (Howard) (Hymenoptera: Encyrtidae)
	<i>Parabemisia myricae</i> (Kuwana) (Hemiptera: Aleyrodidae)	<i>Eretmocerus debachi</i> Rose & Rosen (Hymenoptera: Aphelinidae)
Plagas ocasionales:	<i>Aleurothrix floccosus</i> (Maskell) (Hemiptera: Aleyrodidae)	<i>Cales noacki</i> Howard (Hymenoptera: Aphelinidae)
	<i>Panonychus citri</i> (McGregor) (Acari: Tetranychidae)	<i>Euseius stipulatus</i> (Athias-Henriot) (Acari: Phytoseiidae)
	<i>Aphis (Aphis) spiraeicola</i> Patch y <i>Aphis (Aphis) gossypii</i> Glover (Hemiptera: Aphididae)	<i>Stethorus punctillum</i> Weise (Coleoptera: Coccinellidae)
		<i>Lysiphlebus testaceipes</i> (Cresson), <i>Praon volucre</i> (Haliday) y <i>Trioxys angelicae</i> (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae)
		<i>Scymnus (Scymnus) interruptus</i> (Goeze), <i>Scymnus (Pullus) subvillosus</i> (Goeze) y <i>Propylea quatuordecimpunctata</i> L. (Coleoptera: Coccinellidae)
		<i>Chrysoperla carnea</i> (Stephens) y <i>Chrysopa pallens</i> Rambur (Neuroptera: Chrysopidae)
	<i>Saissetia oleae</i> (Olivier) y <i>Ceroplastes sinensis</i> Del Guercio (Hemiptera: Coccidae)	<i>Metaphycus spp.</i> (Hymenoptera: Encyrtidae)
		<i>Scutellista caerulea</i> (Fonscolombe) (Hymenoptera: Pteromalidae)
	<i>Planococcus citri</i> (Risso) (Hemiptera: Pseudococcidae)	<i>Leptomastix dactylopii</i> Howard y <i>Anagyrus pseudococci</i> (Girault) (Hymenoptera: Encyrtidae)
		<i>Cryptolaemus montrouzieri</i> Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae)
Plagas clave:	<i>Phyllocnistis citrella</i> Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae)	<i>Citrostichus phyllocnistoides</i> (Narayanan) (Hymenoptera: Eulophidae)
	<i>Aonidiella aurantii</i> (Maskell), <i>Aspidiotus nerii</i> Bouche	<i>Aphytis melinus</i> DeBach, <i>Aphytis chrysomphali</i> (Mercet), <i>Aphytis diaspidis</i> (Howard),
	<i>Cornuaspis beckii</i> (Newman) y <i>Parlatoria pergandii</i> Comstock (Hemiptera: Diaspididae)	<i>Aphytis lepidosaphes</i> Compere y <i>Encarsia perniciosi</i> (Tower) (Hymenoptera: Aphelinidae)
	<i>Tetranychus urticae</i> Koch (Acari: Tetranychidae)	<i>Amblyseius (Neoseiulus) californicus</i> (McGregor) y <i>Phytoseiulus persimilis</i> Athias-Henriot (Acari: Tetranychidae)
		<i>Stethorus punctillum</i> Weise (Coleoptera: Coccinellidae)
	<i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae)	<i>Diachasmimorpha tryoni</i> (Cameron) y <i>Fopius arisanus</i> (Sonan)

**Tabla 1.1** Especies fitófagas con potencial de alcanzar el nivel de plaga en cítricos, agrupadas según su grado de control biológico, y sus principales enemigos naturales.

### 1.1.3 Control biológico de plagas en cítricos

El control biológico de plagas en cítricos cuenta con una larga tradición. Así, uno de los casos más paradigmáticos dentro del control biológico clásico es el de la introducción en cítricos de California, a finales del siglo XIX, del coccinélido *Rodolia cardinalis* (Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae) para la regulación de la cochinilla acanalada *Icerya purchasi* Maskell (Hemiptera: Margarodidae). En España, ya ha pasado un siglo desde la introducción de otro coccinélido, *Rhyzobius lophanthae* (Blaisdell), para el control de diaspídidos, considerada como la primera introducción documentada de un invertebrado agente de control biológico en este país (Viñuela et al. 1992).

Casi todos los programas de control biológico utilizados en plagas de cítricos se han basado en la importación y el establecimiento de enemigos naturales exóticos, lo que se conoce como control biológico clásico. En nuestro país, el número de introducciones documentadas de enemigos naturales exóticos es en este cultivo ( $n = 33$ ) muy superior al de otros cultivos ( $n = 9$  en hortalizas, y  $n = 6$  en olivo) (Jacas et al. 2006). El control biológico en cítricos se ha fundamentado en la utilización de enemigos naturales que habitan y actúan en la parte aérea del cultivo. De hecho, todos los enemigos naturales de las especies fitófagas mejor controladas pertenecen a este grupo (Urbaneja et al. 2009a). Al contrario, apenas hay estudios acerca de aquellos enemigos naturales que habitan y actúan en el suelo de los cítricos. Existen varias plagas de importancia económica, como son los áfidos (Hemiptera: Aphididae), la araña roja [*Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)] o la mosca mediterránea de la fruta (*C. capitata*) que pueden encontrarse en este medio, de manera que son potencialmente sensibles a la acción de la fauna útil que allí habita. A día de hoy ya se están llevando a cabo diferentes acciones dirigidas a fomentar y preservar algunos de estos enemigos naturales. Un ejemplo es la siembra de cubiertas vegetales para mejorar el control de *T. urticae* y los estudios realizados por Aguilar-Fenollosa et al. (2009) sobre las relaciones ecológicas existentes entre la comunidad de ácaros asociada a éstas y la que habita en la parte aérea del cultivo. El control biológico realizado por el complejo de depredadores generalistas presentes en este medio puede ser de gran ayuda en los futuros programas de gestión de plagas en cítricos, y en especial de *C. capitata*, siendo por lo tanto necesario profundizar más en el estudio de este sistema.

## 1.2 *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae)

La mosca mediterránea de la fruta, *C. capitata*, es una de las plagas más importantes en la fruticultura mundial. En España, por su gran repercusión económica, es considerada como una de las plagas más graves en cítricos. Aunque tradicionalmente el control de *C. capitata* se ha basado en la aplicación de tratamientos fitosanitarios, la creciente preocupación por las repercusiones tanto ambientales como para la salud humana de éstos (Flessel et al. 1993, Burns et al. 2001), y los elevados costes de cultivo que suponen en la citricultura española, han llevado a la búsqueda de nuevas alternativas para el manejo de esta plaga (Castañera 2007). En este contexto, el control biológico aparece como una herramienta apenas explotada, y dentro de éste, el estudio y posterior utilización de los depredadores polífagos que tienen por hábitat el suelo de los cítricos se nos presenta como un campo aún no explorado que podría complementar sin apenas coste otras estrategias utilizadas para el control de esta plaga.

### 1.2.1 Clasificación taxonómica

De acuerdo con Richards y Davies (1984), la clasificación taxonómica es la siguiente:

- Clase: Insecta
- Orden: Diptera
- Suborden: Brachycera
- Familia: Tephritidae (= Trypetidae)
- Género: *Ceratitis*
- Especie: *capitata*

### 1.2.2 Descripción

*Ceratitis capitata* presenta una metamorfosis completa u holometábola. Su ciclo biológico consta de cuatro estados de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto. El huevo es blanco, alargado y ligeramente curvado, con un tamaño medio de 1 x 0,2 mm. La larva es ápoda-céfala, de color blanco marfil, afilada en la parte anterior y truncada posteriormente. Ésta pasa por tres estadios larvarios (L1, L2 y L3)

diferenciados entre sí por el tamaño y el grado de desarrollo del aparato bucal, de tipo raspador. El pupario es coartado, tiene forma cilíndrica fusiforme con la superficie lisa y vira de color blanco a marrón. El imago desde el interior del pupario evagina y distiende el ptilino, empujando el extremo anterior del pupario que se abre transversalmente y permite así su emergencia (Richards y Davies 1984). El adulto tiene un tamaño de entre 4 y 5 mm de longitud. Su cabeza es de color amarillo con una franja pardusca entre los ojos. Los ojos son rojo púrpura con irisaciones verde-azuladas. La zona dorsal del tórax es de color gris plateado con manchas negras irregulares y con largos pelos laterales y posteriores, mientras que la parte ventral y lateral es amarillenta. Las alas son irisadas, con varias manchas grisáceas, amarillas y negras que caracterizan a la especie. El abdomen, también de color amarillo pardusco, presenta dos franjas transversales grises en la zona dorsal. Las hembras poseen un ovíscapo muy puntiagudo y retráctil (**Fig. 1.1**). Los machos se diferencian muy bien de las hembras por la forma más redondeada del abdomen, y por la presencia en la cabeza de dos quetas orbitales que terminan en una paleta romboide de color negro, carácter que los diferencia del resto de las especies de tefrítidos de importancia agrícola (**Fig. 1.2**).



**Figura 1.1** Hembra adulta de *C. capitata* mostrando el ovíscapo (flecha).

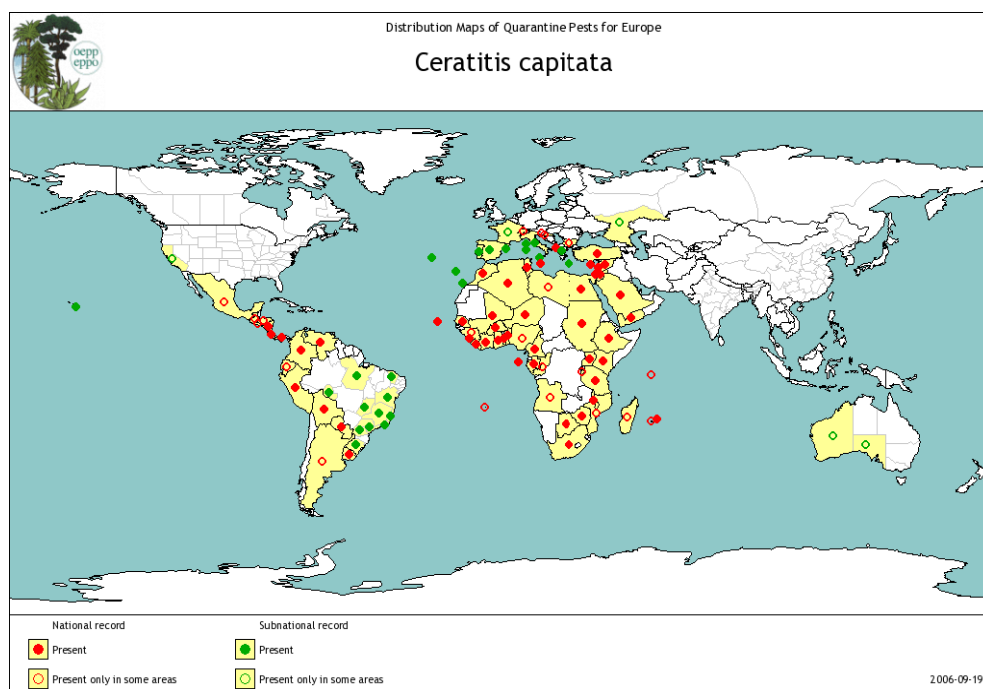


**Figura 1.2** Macho adulto de *C. capitata* mostrando las quetas cefálicas (flechas).

### 1.2.3 Origen y distribución geográfica

El centro de origen de *C. capitata* se supone en la costa nor-occidental africana, desde donde se ha extendido a otras zonas templadas, subtropicales y tropicales de ambos hemisferios. A pesar de no ser originaria del Mediterráneo, se la conoce

como mosca mediterránea de la fruta, ya que es en los países que lo rodean donde su incidencia económica se ha hecho más patente. La mosca mediterránea de la fruta destaca por su gran polifagia; de hecho, ataca a más de 250 especies de frutales y hortícolas, y es especialmente importante el daño que causa en frutales de hueso y de pepita, y en cítricos (Liquido et al. 1991). Su gran polifagia y alta adaptabilidad explican que haya colonizado con tanto éxito diversas regiones templadas del planeta (Papadopoulos et al. 1996). *Ceratitis capitata* se ha convertido en una plaga de gran importancia en las zonas tropicales, subtropicales y mediterráneas. Actualmente afecta a todos los países de la franja mediterránea y está extendida en Asia (India), Sudáfrica, América e incluso en Australia (Hagen et al. 1981, Fimiani 1989, Fletcher 1989, Robinson y Hooper 1989, Steck et al. 1996, Davies et al. 1999). El área de distribución mundial se refleja en la **Fig. 1.3**.



**Figura 1.3** Mapa de distribución mundial de *C. capitata* (Fuente: EPPO, 2006).

### 1.2.4 Ciclo biológico y ecología

En condiciones ambientales favorables, el ciclo biológico de esta especie tiene una duración de menos de un mes. Con temperaturas inferiores a 20°C, el tiempo necesario para completar el ciclo se va alargando y puede alcanzar los 2-3 meses (Christenson y Foote 1960). En la región mediterránea, su actividad queda reducida en invierno, ya que por debajo de los 15°C no realiza la puesta (Bodenheimer 1951). Aunque la reinvasión anual desde regiones con inviernos menos fríos es un hecho constatado, algunas evidencias sugieren que *C. capitata* está establecida de forma permanente en muchas de las áreas templadas, superando las temperaturas más extremas del invierno como larva protegida dentro de los frutos que permanecen en los árboles (Papadopoulos et al. 1996) e incluso como adultos que buscan refugio en cultivos de hoja perenne. Del Pino (2000) demostró que los adultos de esta especie son capaces de sobrevivir durante el invierno en las condiciones que se dan en la Comunidad Valenciana, y pueden aguantar temperaturas ambientales por debajo de 0°C durante varias horas y varias noches. La duración de las distintas fases de desarrollo de esta especie vendrá determinada principalmente por las condiciones de humedad ambiental y temperatura.

La hembra de *C. capitata* puede depositar unos 20 huevos por día y entre 300 y 800 en todo el periodo reproductivo (Weems 1981, Aluja 1993). Tras la eclosión del huevo, las larvas empiezan a alimentarse dentro de la fruta. Una vez alcanzado el tercer estadio larvario, éste abandona la fruta para saltar y pupar enterrado en el suelo a una profundidad de entre 1-5 cm en función del tipo de suelo. Los adultos recién emergidos permanecen también un tiempo sobre la superficie del suelo hasta que son capaces de desplegar completamente las alas y volar. En estado adulto, *C. capitata* se alimenta de secreciones de melaza de insectos homópteros, de excrementos, de las secreciones glandulares de las plantas, de néctar, del jugo de los frutos (Christenson y Foote 1960, Drew et al. 1983), y de secreciones de hojas y brotes (Craig 1960) ya que necesitan una dieta rica en aminoácidos para alcanzar la madurez sexual.

El número de generaciones alcanzadas por año varía en función de las condiciones climáticas y de la presencia de huéspedes durante la época más fría. Así, en zonas templadas con inviernos fríos y sin presencia de frutos desde otoño a primavera, *C. capitata* presenta de 3 a 4 generaciones anuales. El número de generaciones se

incrementa a 7 u 8 cuando las temperaturas mínimas invernales no bajan de los 0°C, y es capaz de superar las 12 generaciones en sus condiciones ambientales más óptimas (Aluja 1993).

En la Comunidad Valenciana, *C. capitata* se desarrolla sobre distintos huéspedes en función de su época de maduración, siendo por lo general como sigue: naranjas tardías, albaricoques, melocotones, peras, manzanas, higos, Caquis y por último, mandarinas y naranjas tempranas (Gómez-Clemente 1948). Este esquema se vuelve a repetir en otras zonas mediterráneas, de manera que los frutales de hueso y pepita sirven como eslabón entre las infestaciones de primavera y las de otoño, y también como refugio de las larvas invernantes (Papadopoulos et al. 2001).

### 1.2.5 Daños e importancia económica

La picadura efectuada por la hembra en la puesta produce un pequeño orificio en la superficie del fruto que desencadena una reacción necrótica a su alrededor, y que se manifiesta en forma de una mácula amarilla en naranjas y mandarinas. La herida producida es vía de entrada de microorganismos que provocan la podredumbre de éste. Además, las larvas al alimentarse de la pulpa, provocan una serie de reacciones que favorecen los procesos de oxidación y maduración prematura del fruto y que dan lugar a su caída.

La enorme importancia económica y social de la mosca mediterránea de la fruta en nuestro país está relacionada con la gran importancia socio-económica de los cítricos en el sector agrario español. Esta circunstancia se ha visto agravada en los últimos años debido a la expansión del cultivo de variedades extra-tempranas (Marisol, Clausellina, Okitsu, etc.), extremadamente sensibles al ataque de la mosca mediterránea de la fruta. A estas pérdidas económicas de tipo directo, hay que sumar las cuantiosas pérdidas derivadas de la imposición de periodos de cuarentena y protocolos de exportación muy restrictivos. En este sentido, cabe señalar por su gravedad, el bloqueo a la exportación de clementinas españolas por parte de Estados Unidos en 2001, con pérdidas cifradas en unos 300 millones de euros (Castañera 2003a).

## 1.2.6 Métodos de control

### 1.2.6.1 Control químico

Tradicionalmente, el control de *C. capitata* en España se ha basado en aplicaciones regulares de insecticidas organofosforados, especialmente malatión, cebados con un atrayente alimenticio (proteínas hidrolizadas) (Primo-Millo et al. 2003). En la Comunidad Valenciana, además de las aplicaciones terrestres, se han realizado aplicaciones aéreas con malatión-cebo como parte de un programa regional de control de esta plaga. La elevada frecuencia de estos tratamientos ha originado la aparición de poblaciones de mosca resistentes a este producto (Ortego et al. 2005, Magaña et al. 2007). Además, los efectos perjudiciales que provocan estos tratamientos sobre la salud humana (Flessel et al. 1993) y el medio ambiente (Burns et al. 2001), y su acción nociva sobre la fauna útil presente en este cultivo (Hoelmer y Dahlsten 1993, Urbaneja et al. 2009b) han llevado a su exclusión del Anexo I del Registro Único Europeo (Directiva 91/414) desde enero de 2009. La salida de escena de este producto ha conllevado una rápida búsqueda de alternativas químicas a este insecticida que cumplan las condiciones de ser eficaces contra esta plaga y a su vez selectivos frente a la fauna útil. El insecticida de origen natural spinosad parece ser el sustituto con mejor acogida al cumplir satisfactoriamente con estas dos condiciones (Chueca et al. 2007, Urbaneja et al. 2009b). Actualmente, un tratamiento cebo con este producto, Spintor Cebo (GF-120, Dow AgroSciences Ibérica, Madrid) consistente en una mezcla de spinosad, azúcares, agua y atrayentes (Dow AgroSciences 2002) está siendo aplicado con éxito para el control de diferentes especies de tefrítidos plaga en distintas partes del Planeta (Burns et al. 2001, Moreno y Mangan 2003, Stark et al. 2004). Otras materias activas recientemente recomendadas en la Comunidad Valenciana son los tratamientos cebo con los piretroides lambda-cihalotrin y etofenprox, y el organofosforado metilclorpirifos. La reducción de los tratamientos químicos sigue siendo una estrategia prioritaria en el control de esta plaga. Por esta razón, el manejo de *C. capitata* se está abordando a través de un plan de actuación integral que conlleva la utilización conjunta de diferentes aproximaciones no contaminantes e inocuas para la salud humana (Castañera 2007).



### **1.2.6.2 Medidas culturales**

El control de focos mediante la eliminación de frutos infestados, recolección y posterior enterrado de fruta no cosechada, y el arranque de frutales aislados o abandonados que se encuentran dentro del área citrícola, son medidas esenciales para poder disminuir las poblaciones de este fitófago a nivel regional (Primo-Millo et al. 2003). Sin embargo, este tipo de medidas son de difícil ejecución, ya que para que sean eficaces, su aplicación debería de realizarse a gran escala (Chueca 2007). De hecho, se ha observado en los últimos años en el área citrícola española una relación directa entre el creciente abandono de huertos, debido a la caída de precios, y un fuerte incremento en las poblaciones de esta plaga.

### **1.2.6.3 Trampeo masivo**

El trampeo masivo consiste en la captura de adultos mediante la utilización de trampas y distintos tipos de atrayentes sintéticos. Actualmente se está generalizando el uso de la trampa Tephri-trap<sup>®</sup> combinada con el atrayente alimenticio Tri-pack<sup>®</sup>, formado por la mezcla de tres componentes (acetato amónico, putrescina y trimetilamina), siendo este formulado de mayor eficiencia que los antiguos atrayentes basados en proteínas hidrolizadas líquidas. Junto al atrayente se pone una pequeña dosis de insecticida para matar las moscas capturadas. La reciente retirada del mercado del diclorvos (DDVP) por aplicación de la Directiva CE 91/414, está llevando a la búsqueda de nuevas materias activas que puedan ser utilizadas como sustitutos de este insecticida (Escudero-Colomar et al. 2009). Las trampas utilizadas en este método de control se suelen disponer de manera homogénea a razón de unas 50 trampas por ha (Fibla et al. 2007), aunque también se han ensayado otras disposiciones de tipo perimetral que buscan evitar invasiones (Papadopoulos et al. 2001). El método de trampeo masivo es especialmente eficaz cuando las poblaciones de la mosca aún no son muy elevadas (0,5 moscas por trampa y día) (Fibla et al. 2007).

En la Comunidad Valenciana, se está utilizando el trampeo masivo en áreas citrícolas que requieren una especial protección, ya sea por su alta densidad de variedades extra-tempranas, por ser inaccesibles mediante los tratamientos convencionales a base de insecticidas, por estar ubicadas en áreas con un determinado valor ecológico, por encontrarse cerca de áreas urbanas, o por tratarse

de frutales aislados (Primo-Millo et al. 2003). Sin embargo, su alto coste desaconseja su uso a gran escala.

### 1.2.6.4 Quimioesterilización

Este método busca disminuir las poblaciones de la plaga mediante la reducción de la fertilidad o la fecundidad de los individuos de una población al entrar en contacto con una sustancia química que afecta negativamente a estos parámetros. Se ha observado que el lufenurón, inhibidor de la síntesis de quitina, anula la eclosión de los huevos puestos por hembras que han ingerido un cebo con un 0,1% de esta materia activa o que han copulado con machos expuestos a esta materia activa (Casaña-Giner et al. 1999). En un programa piloto desarrollado durante 4 años en Valencia, se demostró que la aplicación de este quimioesterilizante, incorporado a un cebo atrayente con difusor de liberación lenta, reducía significativamente la población de *C. capitata* (Navarro-Llopis et al. 2004, 2007a). Actualmente se comercializan trampas con el atrayente y el cebo que incorpora la materia activa (Adress<sup>®</sup>, Syngenta Agro S.A., España). Se recomienda la utilización de 24 trampas por ha, lo que supone un coste de aproximadamente 150 euros/ha. La quimioesterilización es una técnica que no deja residuo en la fruta. Además, gracias a su transmisión horizontal de machos a hembras, actúa efectivamente sobre un porcentaje de la población, y se obtienen por lo tanto, resultados evidentes con poblaciones elevadas de mosca (Navarro-Llopis et al. 2007b). La quimioesterilización podría afectar a otros componentes de la comunidad de artrópodos del cultivo, al verse atraídos por el cebo. En los estudios realizados hasta la fecha, no se ha observado ningún efecto perjudicial sobre la fauna útil (Navarro-Llopis et al. 2007b).

### 1.2.6.5 Control autocida

El método de control autocida o técnica del insecto estéril (TIE) se basa en la esterilización por irradiación de un gran número de machos que al ser liberados compiten con los machos salvajes por fecundar a las hembras salvajes (Kniplín 1955). La descendencia producida por hembras que han copulado con estos machos irradiados no es viable, lo que repercute de forma negativa sobre las poblaciones salvajes de esta plaga (San Andrés et al. 2009). Los programas TIE son un método no contaminante de prevención, supresión o erradicación de *C. capitata* que está siendo aplicado en diferentes países (Liquist 2000, Hendrichs et al. 2002). En

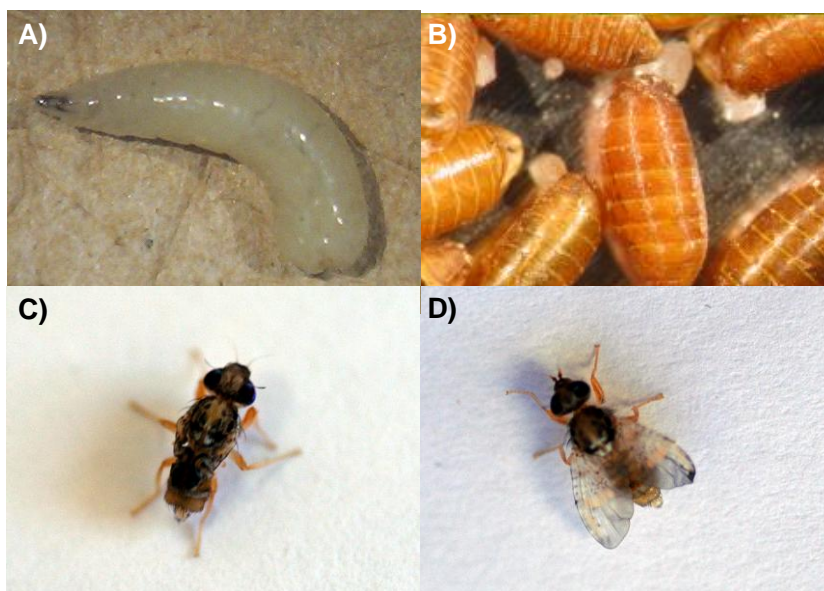
España este método fue utilizado por primera vez en Tenerife, Murcia y Granada (Mellado 1917, Mellado et al. 1974). Desde 2002 existe un programa piloto de lucha autocida contra esta plaga en la Comunidad Valenciana (Primo-Millo et al. 2003, San Andrés 2008). En un principio, las moscas estériles eran importadas desde Argentina, se hacían evolucionar en Moncada (Valencia) y fueron utilizadas en estudios a pequeña y mediana escala con resultados satisfactorios. En 2007, la Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación inauguró en Caudete de las Fuentes (Valencia) una biofábrica para producir y liberar machos estériles a gran escala. La eficiencia de esta técnica es mucho más evidente cuando las poblaciones salvajes de la mosca son bajas. Por esta razón su utilización ha de ser complementada con la de otros métodos de control (Argilés y Tejedo 2007).

#### 1.2.6.6 Control biológico

El control biológico de esta plaga se ha basado principalmente en las sueltas inundativas de parasitoides. Éstas se han aplicado en campo en varios países con diferentes grados de éxito. El primer programa de control biológico que utilizaba parasitoides foráneos se llevó a cabo en 1902 en Australia. Los mayores éxitos se lograron en Hawaii en los años 1950 con la introducción de *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) y *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) (Wong et al. 1991). En España, a comienzos de los años 30 se intentó la cría y establecimiento sin éxito de los braconidos, *Psytalia humilis* (Silvestri) y *D. tryoni* (Gómez-Clemente 1932, 1934). Con el auge del control químico en la agricultura, el control biológico de esta plaga quedó relegado a un segundo plano. No obstante, en 1960 se introdujo el himenóptero eulófido *Tetrastichus giffardianus* (Silvestri) en Tenerife, especie supuestamente establecida pero cuya efectividad no se ha evaluado nunca (Moner et al. 1988).

En el año 2002, se importaron dos especies de braconidos parasitoides, *D. tryoni*, parasitoide de larvas, y *Fopius arisanus* (Sonan), parasitoide de huevos (Castañera 2003b). *Diachasmimorpha tryoni*, nativo de Australia, fue introducido en Hawaii hacia 1910, y rápidamente contribuyó a la reducción de las poblaciones de *C. capitata*, mientras que, *F. arisanus*, nativo del sureste asiático, ha sido introducido en diferentes regiones tropicales como Hawaii, Florida, Australia, Costa Rica, las islas Fidji o Italia (Snowball y Lukins 1966, Purcell 1998, Calvitti et al. 2002). Con estas dos especies se han llevado a cabo ensayos en laboratorio y en semi-campo para

poder determinar su potencial como agentes de control en España (Beitia et al. 2007), aunque su capacidad de adaptación a nuestras condiciones no está todavía determinada. En algunos países como México, Guatemala o Costa Rica, se está aplicando con éxito la liberación combinada de machos estériles y parasitoides (Gurr y Kvedaras 2009).



**Figura 1.4** Estados de desarrollo biológico de *C. capitata* que se dan en el suelo de cítricos: **A)** Larvas de 3º estadio, **B)** estado de pupa, **C)** adulto recién emergido, con las alas sin desplegar y **D)** adulto con las alas parcialmente desplegadas.

Otros agentes potenciales de control biológico de *C. capitata* son los depredadores polífagos presentes en el suelo de este cultivo. Como ya se ha comentado, la mosca mediterránea de la fruta desarrolla parte de su ciclo biológico en este medio. Así, tanto larvas de tercer estadio, como pupas y adultos recién emergidos son sensibles a la acción de estos depredadores (**Fig. 1.4**). Existen algunos trabajos que citan a hormigas, carábidos, estafilínidos y arañas como depredadores de larvas y pupas de moscas de la fruta (Eskafi y Kolbe 1990, Galli y Rampazo 1996, Urbaneja et al. 2006). Aun así son pocos los estudios que hayan evaluado el impacto de este tipo de depredadores sobre *C. capitata* (Debouzie 1989). La utilización de manera efectiva de estos enemigos naturales pasa por la gestión y conservación de sus poblaciones,

principalmente a través de la manipulación de su hábitat (Barbosa 1998). Los largos, complejos y laboriosos estudios sobre la bioecología de estos enemigos naturales que conlleva este tipo de estrategia son la principal causa que ha llevado a despreciar su papel potencial en el control de esta plaga.

## 1.3 Objetivos

La presente Tesis pretende estudiar las comunidades de depredadores polípagos que habitan en el suelo de los cítricos de la Comunidad Valenciana y evaluar su papel en el control de *C. capitata*. Un conocimiento más profundo de este sistema permitirá su incorporación en las actuales estrategias no contaminantes utilizadas para la gestión de esta plaga. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

- 1. Identificar y evaluar el complejo de depredadores generalistas presentes en el suelo de cítricos.**
  - a. Conocer los grupos de depredadores que lo componen.
  - b. Estudiar la actividad-densidad, composición y riqueza específica, y estructura poblacional de estos grupos, asociados a los distintos manejos del suelo más representativos de los cítricos.
  - c. Determinar las actividades estacionales de estos grupos así como de las especies más importantes de cada uno de ellos.
  
- 2. Evaluar en condiciones de laboratorio la capacidad depredadora frente a *C. capitata* de las especies más representativas de cada grupo de depredadores.**
  - a. Evaluar la preferencia por los distintos estados biológicos de *C. capitata* presentes en el suelo de cítricos.
  - b. Obtener las curvas de respuesta funcional de los depredadores prevalentes frente a los distintos estados de *C. capitata* para comparar la eficiencia de cada depredador.
  
- 3. Determinar en condiciones de campo, mediante marcadores moleculares, los depredadores más eficientes de *C. capitata*.**
  - a. Diseñar marcadores moleculares específicos frente a *C. capitata*.

- b. Determinar en laboratorio tiempos máximos de detección de la presa en los tractos digestivos de las especies de depredadores seleccionadas.
  - c. Utilizar estos marcadores con especímenes salvajes capturados en parcelas comerciales de cítricos para determinar si *C. capitata* forma parte de su dieta.
- 4. Desarrollar un anticuerpo monoclonal específico frente a *C. capitata* que permita evaluar a gran escala la acción ejercida sobre esta plaga por el complejo de depredadores polífagos en suelos de cítricos.**
- a. Obtención de un anticuerpo monoclonal de expresión en fagos, específico frente a *C. capitata*.
  - b. Obtención de un anticuerpo policlonal de conejo específico frente a *C. capitata*.
  - c. Comparación de los parámetros de sensibilidad y especificidad de ambos tipos de anticuerpo.





## **2 Identificación del complejo de depredadores polífagos presentes en el suelo de cítricos**





## 2.1 Introducción

A pesar de la larga tradición con la que cuenta el control biológico en la citricultura española (Jacas et al. 2006), la mayor parte de ejemplos son referidos a enemigos naturales específicos que habitan y actúan en la parte aérea. Sin embargo, el tipo de gestión de este cultivo, permite la existencia de hábitats epigeos semipermanentes capaces de albergar una rica comunidad de artrópodos con diferentes hábitos alimenticios. Entre ellos, el complejo de depredadores generalistas se nos presenta como una herramienta potencial de gran utilidad para la gestión de aquellas plagas que, como *C. capitata*, pueden aparecer en este hábitat. En contraste con lo que ocurre en la parte aérea, apenas existen estudios en cítricos que describan este complejo y evalúen su papel como agentes de control biológico (Urbaneja et al. 2006).

Aunque en la agricultura tradicional el manejo de plagas se ha sustentado principalmente en la acción de los enemigos naturales generalistas autóctonos (Symondson et al. 2002a), en las últimas décadas, el control biológico se ha basado en el estudio, evaluación y utilización de enemigos naturales con un elevado grado de especialización en sus presas, que además son en numerosas ocasiones de procedencia exótica. Este tipo de enemigos, con alta capacidad de respuesta a las poblaciones de la plaga, gracias a una elevada eficacia en los procesos de búsqueda, captura y manejo de la presa (respuesta funcional) y a su facilidad para incrementar sus poblaciones cuando lo hacen las del fitófago (respuesta numérica), ha sido mejor considerado que los enemigos naturales de hábitos generalistas (Hassell y May 1986). Además, su estudio y manejo es mucho más sencillo que el de estos últimos. Los depredadores generalistas poseen unas relaciones tróficas mucho más complejas, donde son frecuentes fenómenos tales como la depredación secundaria (Sheppard et al. 2005), el canibalismo (Borre et al. 2006, Wise 2006), o los comportamientos carroñeros (Foltan et al. 2005, King et al. 2008), que dificultan la evaluación del impacto real de éstos sobre los fitófagos; para poder subsistir, sus poblaciones suelen sustentarse en un amplio rango de presas, lo cual era interpretado como un menor grado de especialización y por lo tanto de eficiencia en su acción; en general sus ciclos de vida prolongados les impiden responder de manera rápida a las explosiones de un fitófago, conllevando además unos procesos más largos de establecimiento en un hábitat determinado. Muchos de estos rasgos,

denunciados en el pasado como poco convenientes a la hora de llevar a cabo un control efectivo de la plaga (Sabelis 1992), con los nuevos puntos de vista más globales e integradores de las teorías de la depredación, han pasado a ser reconocidos como cualidades favorables en los sistemas depredador-presa (Symondson et al. 2002a). Así, la capacidad de alimentarse sobre un amplio rango de presas (Holt y Lawton 1994, Harper et al. 2005) y la independencia de sus poblaciones de las del fitófago (Lövei y Sunderland 1996), va a permitir la presencia del depredador en niveles suficientes cuando el fitófago aun no está presente o ya ha desaparecido (Symondson et al. 2002a). Sus hábitos alimenticios oportunistas que les permiten explotar rápidamente muchos tipos de presa, pueden ser de vital importancia a la hora de poder actuar frente a cualquier plaga de nueva introducción. El canibalismo ayuda a mantener las poblaciones del depredador en los periodos de mayor escasez de presa ("estrategia del bote salvavidas", [Wise 2006]), e incluso comportamientos carroñeros supondrán números más elevados en las poblaciones del depredador (Sunderland 1996) y pueden servir para atraer a éstos hacia lugares donde hay una mayor densidad de presas vivas (Juen y Traugott 2005).

La utilización de uno de estos dos tipos de depredadores, generalista o especialista, no tiene por qué ser excluyente del otro. Contrariamente, su acción conjunta puede muchas veces resultar en un efecto sinérgico. La presencia de depredadores generalistas cuando los niveles de plaga son muy bajos va a suponer un efecto de contención, evitando que se disparen las poblaciones del fitófago hasta la más tardía llegada del especialista (Sunderland 1999, Symonson et al. 2002a). Por otro lado, la actuación del especialista en la parte aérea muchas veces conlleva la caída de presas de la planta al suelo, donde éstas pueden ser utilizadas por el generalista (Losey y Denno 1998, Kromp 1999).

A día de hoy, se considera que la acción conjunta de todo el complejo de depredadores generalistas puede realizar un control efectivo sobre las poblaciones de un fitófago (Sunderland et al. 1997, Symondson et al. 2002a, Nyffeller y Sunderland 2003, Moreno et al. 2010). De hecho, se piensa que la combinación de las distintas estrategias de caza que utilizan las diferentes especies que componen este complejo (Marc y Canard 1997), puede resultar en una eficiencia mayor a la acción de un especialista. Además, debido a la gran diversidad de hábitos alimenticios de los distintos componentes del complejo, así como a sus diferentes patrones de actividad estacional, en numerosos casos, todos los estados biológicos

de la plaga pueden ser sensibles a la acción de estos depredadores y en cualquier época del año (Symondson et al. 2002a). Por esta razón, el manejo de las poblaciones de este complejo mediante la manipulación de su hábitat (Landis et al. 2000), conocido como control biológico de conservación, se presenta como una de las estrategias más interesantes y a su vez menos explotadas, para el control de un amplio rango de especies plaga, tanto autóctonas como exóticas (Symondson et al. 2002a).

Los órdenes Araneae, Dermaptera, y las familias Carabidae, Cicindelidae y Staphylinidae del orden Coleoptera, son los grupos de mayor tradición en los estudios de depredadores generalistas epigeos realizados en diferentes sistemas agrícolas (Kromp 1999, Sunderland 1999, Symondson et al. 2002a). En el presente trabajo, definiremos por “grupo” a aquellas especies de depredadores filogenéticamente relacionadas que además comparten una misma área geográfica de distribución, un mismo tipo de hábitat y similares recursos alimenticios.

Las arañas, junto a los carábidos, probablemente sean el grupo de depredadores polífagos más estudiado (Riechert y Lockley 1984, Sunderland 1999, Symondson et al. 2002a). El orden Araneae es uno de los más diversos del planeta con 41.000 especies descritas (Platnick 2009) y entre 60.000 y 170.000 especies estimadas (Coddington y Levi 1991). Las arañas pueden ser encontradas en elevada abundancia en muchos tipos de agroecosistemas (Mansour et al. 1980, Orazé y Grigarick 1989) mostrando además, todas las especies conocidas de este orden un comportamiento depredador, generalmente insectívoro (Thompson 1984). Los grupos de arañas han sido capaces de reducir de manera significativa las poblaciones de diferentes especies plaga (Mansour y Whitecomb 1986, Sunderland et al. 1997, Sunderland 1999).

Existen aproximadamente 40.000 especies de carábidos descritas (Lövei y Sunderland 1996). La inclusión de los carábidos dentro del control biológico disfruta de una larga tradición, principalmente en la agricultura centro-europea; de hecho, existen numerosas revisiones que evalúan su papel como agentes controladores de especies plaga (Thiele 1977, Allen 1979, Luff 1987, Lövei y Sunderland 1996, Kromp 1999). Numerosos estudios de control biológico identifican a esta familia como depredadores de pulgones (Loughridge y Luff 1983, Holopainen y Helenius 1992, Kiehl et al. 1996). También hay algunos trabajos que los citan como depredadores

voraces de pupas, larvas y huevos de dípteros (Allen y Hagley 1990, Tolonen 1995, Lys 1995).

La familia Staphylinidae es la segunda más diversa del orden Coleoptera. Hasta la fecha se han descrito unas 47.000 especies en todo el planeta (Peck y Thayer 2003). El estudio del potencial depredador de esta familia en los sistemas agrícolas cuenta también con una larga tradición y son considerados importantes enemigos naturales de diferentes plagas de cereales (Dennis et al. 1990, Winder 1990). Actualmente existen algunas especies como *Atheta coriaria* (Kraatz) que son producidas de manera comercial (Atheta-System®, BIOBEST S.L., Almería) para el control de larvas de esciáridos (Diptera: Sciaridae) y de *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera) en cultivos bajo invernadero.

Los dermápteros también han sido citados como agentes de control de numerosas plagas agrícolas (Carroll et al. 1985, Lenfant et al. 1994, Asante 1995, Piñol et al. 2009). Sus hábitos alimenticios son omnívoros (Mueller et al. 1988).

La familia Cicindelidae está muy relacionada con la familia Carabidae. Así, muchos autores la incluyen como una subfamilia de esta última (Pearson y Vogler 2001). Los cicindélidos se caracterizan por su comportamiento depredador muy voraz, aunque generalmente se les asocia más a ecosistemas forestales. De hecho, aparte de su valor como potenciales depredadores en los sistemas agrícolas, también destacan por su extendido uso como bioindicadores (Pearson y Vogler 2001).

Los parámetros de abundancia, actividad estacional y riqueza de especies de un grupo de depredadores polífagos son de gran importancia para el control biológico. Existen numerosos estudios que relacionan la abundancia de los depredadores con el grado de incidencia en una especie plaga, de manera que se requieren densidades elevadas de éstos para conseguir un control eficiente del fitófago (Symondson et al. 2002b, Schmidt et al. 2005). La fenología de estos depredadores nos va a permitir conocer qué componentes del complejo se van a mostrar más activos cuando la plaga está presente. Una elevada diversidad en especies y genotipos supone una mayor variedad de estrategias de búsqueda y captura de la presa, incrementa la probabilidad de que todos los estados biológicos de ésta estén expuestos a la acción de los depredadores, y aumenta también la probabilidad de que existan componentes del complejo capaces de utilizar de manera eficiente la especie plaga como presa.

Un conocimiento más profundo del complejo de depredadores polífagos existente en los suelos de cítricos nos ayudará a entender cuáles son sus requerimientos ecológicos, qué potencial nos pueden ofrecer como agentes de control biológico, y sentará las bases para poder gestionar sus poblaciones en las diferentes estrategias de control biológico de conservación en este cultivo. En este capítulo se realiza un estudio del complejo de depredadores polífagos presentes en los suelos de cítricos, utilizando trampas de gravedad. Se ha estudiado la abundancia-densidad y composición específica de los distintos grupos de depredadores que componen todo el complejo, así como la actividad estacional de estos grupos y de aquellas especies más capturadas. Las poblaciones de estos depredadores parecen estar muy ligadas al tipo de gestión de suelo en el cultivo (Holliday y Hagley 1984, Sunderland y Samu 2000, Landis et al. 2000). Por esta razón, nuestro estudio se ha realizado sobre los tres tipos de gestión del suelo más representativos de la citricultura española: suelos libres de la presencia de especies vegetales, mantenimiento de una cubierta vegetal espontánea y siembra de cubiertas monoespecíficas con la gramínea *Festuca arundinacea* Schreber (Poaceae).

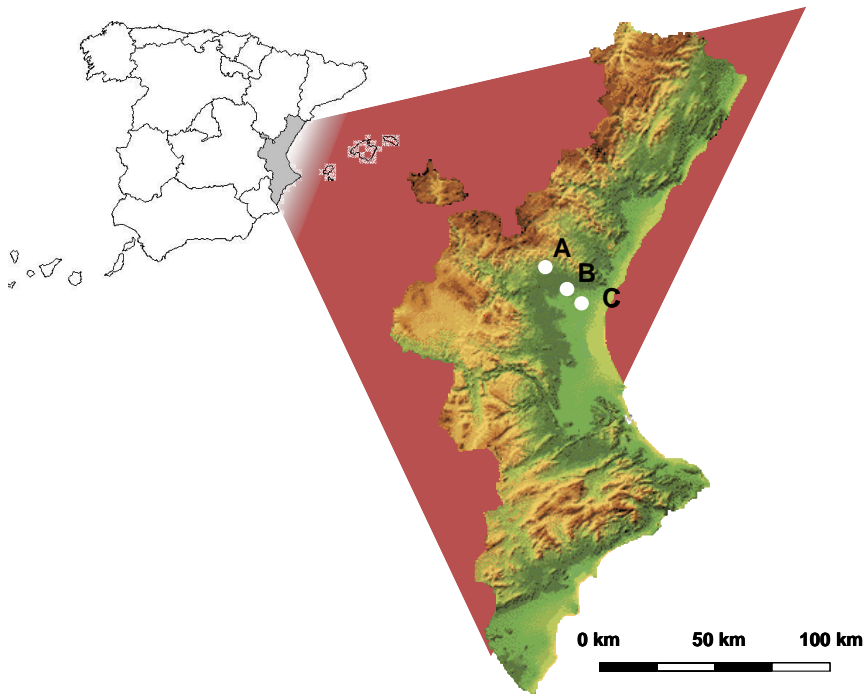
## 2.2 Material y métodos

### 2.2.1 Diseño experimental

El estudio de los depredadores polífagos de los suelos de cítricos se realizó en tres parcelas comerciales de aproximadamente 1 ha de superficie situadas en los términos municipales de Bétera (UTM: X722106 Y4388610; 30 msnm), Olocau (UTM: X706741 Y4400206; 330 msnm) y Náquera (UTM: X722427 Y4385216; 110 mnm) (**Fig. 2.1**). Las parcelas de Bétera y Olocau estaban plantadas con mandarinos de la variedad Clemenules. En la parcela de Bétera entre los mandarinos aparecía algún pie aislado de naranjo variedad Navelina. La parcela de Náquera era una plantación de naranjos de la variedad Navelina. Las parcelas de Bétera y Olocau conservaban una cubierta vegetal permanente mientras que en la de Náquera se mantenía el suelo libre de vegetación. En los tres casos, las parcelas llevaban un sistema de riego por goteo y éstas se encontraban rodeadas por otros huertos de cítricos. El control de la flora arvense en la parcela de Náquera se realizaba mediante aplicaciones periódicas del herbicida glifosato desde inicios de la primavera a finales de otoño. En Bétera se mantenía una cubierta vegetal espontánea que se segaba una o dos veces en primavera, dependiendo de la pluviometría de la estación, y otra vez en otoño. En la parcela de Olocau, se había sembrado una cubierta monoespecífica con la gramínea *Festuca arundinacea* Schreber (Poaceae), que se mantenía con una siega a mediados de primavera y una segunda siega opcional en otoño en función de la aridez de la temporada.

En este estudio se evaluó la fauna de artrópodos depredadores epígeos pertenecientes a los órdenes Araneae, Dermpatera, y las familias Carabidae, Cicindelidae y Staphylinidae del orden Coleoptera. Para ello, se utilizaron trampas de gravedad, y con los datos generados a partir de éstas se analizó la composición específica, estructura poblacional y actividad estacional de los grupos de depredadores citados. En cada una de las parcelas se instalaron 12 trampas siguiendo la diagonal del campo y con una separación de aproximadamente 10 m entre ellas. Cada una de las trampas consistía en un recipiente de plástico de 12,5 cm de diámetro y 12 cm de profundidad, con un pequeño agujero en su base para permitir el drenaje del agua de lluvia; un embudo de plástico con una luz superior





**Figura 2.1** Situación geográfica de las parcelas muestreadas: A) Olocau, B) Náquera, C) Bétera.

también de 12,5 cm de diámetro, de manera que encajase perfectamente en el recipiente de plástico; y un bote de plástico de un volumen de 150 ml que se rellenaba con una mezcla 70% etanol, 20,9% agua, 9% etilenglicol y 0,1% detergente. El alcohol realizaba las funciones de conservante, el etilenglicol evitaba la rápida evaporación de la mezcla y el detergente disminuía la tensión superficial de ésta. El recipiente de plástico de mayor volumen se enterraba a ras del suelo, en su interior se depositaba el bote de plástico con la mezcla, y acoplado a ambos recipientes se situaba el embudo de manera que éste quedaba a ras del suelo y los artrópodos que pasaban por encima caían al recipiente con la mezcla conservante (Fig. 2.2).



**Figura 2.2** Componentes y proceso de instalación de una trampa de gravedad.

El periodo de muestreo comprendió desde abril de 2004 a abril de 2007 en Náquera y Olocau, y desde agosto de 2003 a agosto de 2006 en la parcela de Bétera. El bote con la mezcla conservante se renovaba cada dos semanas y los especímenes de los distintos grupos de depredadores se determinaban taxonómicamente hasta nivel de especie en la mayoría de adultos, y hasta nivel de familia con los estados inmaduros.

## **2.2.2 Análisis de datos**

### **2.2.2.1 Patrones de actividad-densidad**

Para cada fecha y sitio de muestreo se calculó el número medio de especímenes capturados por trampa y día pertenecientes a cada uno de los grupos de depredadores estudiados, y también a las especies más frecuentes de estos grupos. Los valores se expresaron como promedio  $\pm$  error estándar.

Para poder explicar la variabilidad en las capturas, entre años y estaciones meteorológicas del año, el número de especímenes adultos de cada uno de los grupos estudiados acumulado por trampa y estación fue analizado mediante el uso de un modelo lineal mixto generalizado con medidas repetidas (SAS 2004). En el

tratamiento de datos se asumió una distribución binomial negativa de la variable dependiente. Año y estación fueron considerados como factores fijos, y trampa como aleatorio. Cuando la interacción entre ambos factores fijos era significativa también se incluyó en el modelo. Las comparaciones entre estaciones se realizaron mediante un test LSD ajustando la significación mediante la corrección de Bonferroni.

### **2.2.2.2 Indicadores de estructura poblacional**

Para poder estudiar la estructura poblacional de aquellos grupos de depredadores con mayor número de capturas y más ricos en especies, se ajustaron los datos de abundancia a los modelos teóricos de distribución log-normal, series logarítmicas y series geométricas (Magurran 1998). Las distribuciones log-normal son características de grupos o comunidades bien estructuradas, mientras que tanto las series logarítmicas como especialmente las series geométricas describen mejor las comunidades presentes en medios degradados (Magurran 2004). En un ajuste al modelo teórico log-normal, como los datos con los que se construye la distribución pertenecen a una muestra de la población, es probable que no todas las especies menos abundantes estén registradas, por lo que la cola izquierda de la distribución muchas veces no aparece. Por esta razón, se utilizó el método de Preston (1948), y se ajustaron los datos a una distribución log-normal truncada.

El ajuste de nuestros datos a los distintos tipos de distribución se realizó utilizando el test estadístico de Kolmogorov-Smirnov, ya que éste puede aplicarse a muestras de pequeño tamaño sin perder efectividad (Tokeshi 1993, Sokal y Rohlf 1995). Como paso previo al ajuste de datos se representaron gráficamente las distribuciones reales de cada uno de los grupos analizados. Las especies se separaron en clases de abundancia (octavas) con límites 1, 3, 9, 27, 81, etc., siguiendo el método de Preston utilizando logaritmos en base 3. Los datos de aquellos grupos que no presentaban una distribución log-normal característica, con una moda lejos de las primeras octavas, no eran ajustados a este tipo de distribución teórica.

### **2.2.2.3 Estimación de la riqueza de especies**

El número real de especies de cada uno de los grupos muestreados se estimó utilizando dos aproximaciones. En la primera, se ajustaron los datos de abundancia a una distribución log-normal y posteriormente se estimó la parte oculta o no muestreada de la distribución (estimación paramétrica) (Preston 1948). Este método

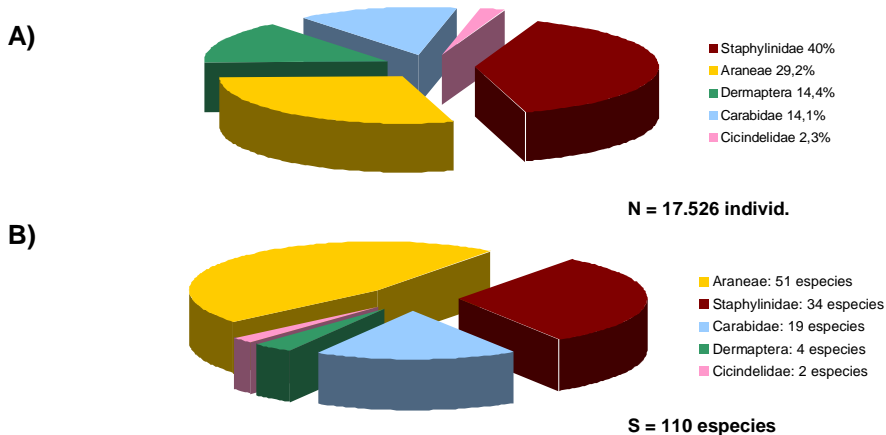
se utilizó con aquellas distribuciones en las que el ajuste a este modelo teórico era significativo. En la segunda aproximación se aplicaron diferentes estimadores de riqueza no paramétricos, que utilizan la abundancia relativa de las especies menos frecuentes para poder estimar las especies aún no muestreadas (Bunge y Fitzpatrick 1993, Colwell y Coddington 1994). Se representó gráficamente el valor medio de cada estimador no paramétrico frente a un incremento del número de muestras, después de realizar 50 reordenaciones aleatorias de éstas. Este tipo de análisis nos va a indicar cómo se comporta el estimador de riqueza conforme se va añadiendo más información. Si la curva de un estimador alcanza una asíntota antes de que todas las muestras hayan sido añadidas al análisis, el valor obtenido podrá considerarse como una estimación fiable del número de especies que conforman el grupo muestreado. Por el contrario, si el valor obtenido sigue incrementándose conforme se aumenta el tamaño muestral, la estimación de riqueza obtenida probablemente esté sesgada por no tener un muestreo lo suficientemente completo (Colwell y Coddington 1994, Logino et al. 2002). Para calcular la riqueza de especies con los distintos estimadores no paramétricos y para estudiar la estabilidad de éstos al añadir más muestras, se utilizó el software libre Estimates 8.0 (Estimates 2006). En este estudio se utilizaron los índices no paramétricos Chao1 y Chao2 (Chao et al. 1993, Lee y Chao 1994, Colwell y Coddington 1994), Incidence-base Coverage Estimator (ICE), Abundance-base Coverage Estimator (ACE) (Chao et al. 1993, Lee y Chao 1994), y los estimadores Jackknife de primer orden (Jack1) y Jackknife de segundo orden (Jack2) (Colwell y Coddington 1994). Con cada grupo de depredadores se seleccionaron aquellos índices que daban estimaciones más estables con el incremento de muestras en el análisis. Con los datos de los grupos de carábidos también se estimó el número de especies utilizando la ecuación de Michaelis-Menten como modelo asintótico de las curvas de acumulación de especies (Raaijmakers 1987, Colwell y Coddington 1994).

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Artrópodos depredadores

Durante los 3 años de muestreo con trampas de gravedad se capturaron 17.526 especímenes adultos de artrópodos depredadores, agrupados en 110 especies diferentes pertenecientes a los órdenes Araneae, Dermaptera y las familias Carabidae, Staphylinidae y Cicindelidae. El grupo de depredadores más importante en número de capturas fue el de los estafilínidos, que supuso el 40% de todas ellas. Las arañas, con un 29,2% de capturas, fue el segundo en importancia. Carábidos y dermápteros se encontraron en números similares (2.524 y 2.472 adultos cada uno de ellos). La familia Cicindelidae, con 407 especímenes encontrados, fue la de menor presencia (**Fig. 2.3**).

Al evaluar la riqueza en especies, el orden Araneae fue el grupo más diverso con 51 especies diferenciadas, seguido por la familia Staphylinidae (34 especies) y Carabidae (19 especies). El Orden Dermaptera y la familia Cicindelidae fueron los grupos de depredadores menos diversos, con 4 y 2 especies encontradas respectivamente (**Fig. 2.3**).



**Figura 2.3** Composición de la abundancia relativa (**A**) y riqueza específica (**B**) de los distintos grupos de depredadores polífagos encontrados en suelos de cítricos tras tres años de muestreos con trampas de gravedad en tres parcelas de cítricos de la provincia de Valencia.

## 2.3.2 Arañas

### 2.3.2.1 Composición de especies y abundancia relativa

Se capturaron un total de 5.116 especímenes adultos de araña agrupados en 51 especies y 20 familias diferentes (**Tabla 2.1**). Las familias Gnaphosidae, Linyphiidae y Salticidae fueron las más diversas en cuanto a número de especies (8 especies encontradas en cada una de ellas). Por otro lado, Lycosidae ( $n = 1.971$ ), Gnaphosidae (1.353) y Zodariidae (980) fueron las familias más destacadas en número de capturas. El licósido *Pardosa cribata* Simon (**Fig. 2.27**) fue la especie más capturada con 1.151 individuos recolectados, lo que representa el 22,5% del total de las capturas de arañas. Esta especie apareció con una frecuencia elevada en los tres sitios de muestreo. La segunda especie de araña más capturada fue *Zodarion* sp. con 947 adultos encontrados. En este caso, el 96,8% de las capturas fueron obtenidas en la parcela de Bétera.

### 2.3.2.2 Patrones de actividad-densidad

Las arañas pudieron encontrarse a lo largo de todo el año en los tres huertos muestreados. Al analizar la actividad estacional de este grupo, se encontraron diferencias significativas entre las distintas estaciones del año ( $P < 0.0001$  para las tres localizaciones) (**Fig. 2.4**). En general, el mayor número de capturas fue obtenido en verano, con picos secundarios en primavera y otoño dependiendo de la parcela y año de muestreos (**Tabla 2.2, Fig. 2.4**). Además, la especie más abundante, *P. cribata*, se mostró activa en invierno, aunque en valores reducidos. En general, las especies de araña que más actividad registraron, siguieron una tendencia similar a la descrita para todo el grupo (**Fig. 2.5, 2.6, 2.7 y 2.8**).

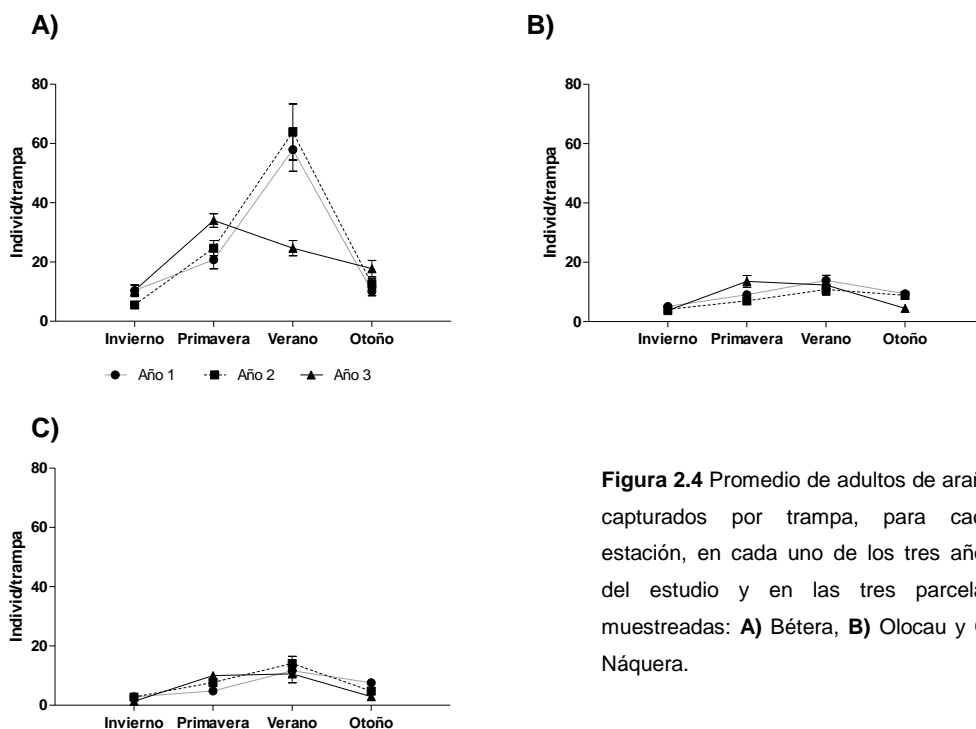
Al estudiar cada parcela por separado, no se encontraron diferencias significativas en el número de capturas entre los distintos años de muestreo. (Bétera,  $P = 0,5288$ ; Olocau  $P = 0,0730$  y Náquera  $P = 0,0916$ ). Se observó una interacción entre año y estación para los tres huertos (Bétera,  $P < 0,0001$ ; Olocau  $P = 0,0003$  y Náquera,  $P = 0,0011$ ). Este resultado es consecuencia del tercer año de estudio donde las poblaciones de araña mostraron un comportamiento diferente (mayor número de capturas en primavera) al de los dos años anteriores (**Fig. 2.4**).

Familia	Especie	Bétera	Olocau	Náquera	Total
Lycosidae	<i>Pardosa cribata</i> Simon, 1878	786	111	254	1.151
Zodariidae	<i>Zodarion</i> sp.	917	16	14	947
Gnaphosidae	<i>Trachyzelotes fuscipes</i> (L. Koch, 1836)	200	272	86	558
Lycosidae	<i>Arctosa perita</i> (Latreille, 1799)	165	77	53	295
Gnaphosidae	<i>Setaphis carmeli</i> (O.P. Cambridge, 1872)	143	71	58	272
Dysderidae	<i>Dysdera crocata</i> C.L. Koch, 1838	87	45	120	252
Linyphiidae	<i>Erigone dentipalpis</i> (Wider, 1834)	112	53	50	215
Lycosidae	<i>Alopecosa albofasciata</i> (Brullé, 1832)	72	32	60	164
Linyphiidae	<i>Meioneta fuscipalpis</i> (C.L. Koch, 1836)	78	58	24	160
Thomisidae	<i>Xysticus bliteus</i> (Simon, 1875)	110	10	7	127
Lycosidae	<i>Hogna radiata</i> (Latreille, 1817)	64	33	8	105
Gnaphosidae	<i>Haplodrassus dalmatensis</i> (L. Koch, 1866)	34	50	16	100
Nemesiidae	<i>Nemesia dubia</i> O. P. Cambridge, 1874	27	33	18	78
Linyphiidae	<i>Typhochrestus digitatus</i> (O.P. Cambridge, 1872)	61	7	6	74
Linyphiidae	<i>Tenuiphantes zimmermanni</i> (Bertkau, 1890)	15	50	7	72
Titanoecidae	<i>Titanoeca tristis</i> L.Koch, 1872	28	21	11	60
Agelenidae	<i>Textris coarctata</i> (Dufour, 1831)	13	28	16	57
Gnaphosidae	<i>Micaria dives</i> (Lucas, 1846)	5	31	17	53
Linyphiidae	<i>Pelecopsis inedita</i> (O.P. Cambridge, 1875)	36	5	8	49
Liocranidae	<i>Phrurolithus minimus</i> C.L. Koch, 1839	21	11	2	34
Salticidae	<i>Aelurillus aeruginosus</i> (Simon, 1871)	13	5	15	33
Salticidae	<i>Phlegma bresnieri</i> (Lucas, 1846)	21	3	5	29
Thomisidae	<i>Xysticus nubilus</i> Simon, 1875	17	5	4	26
Agelenidae	<i>Tegenaria fuesslini</i> (Pavesi, 1873)	3	21	2	26
Philodromidae	<i>Thanatus vulgaris</i> Simon, 1870	18	3	3	24
Gnaphosidae	<i>Zelotes tenuis</i> (L. Koch, 1866)	6	6	7	19
Agelenidae	<i>Textris caudata</i> L. Koch, 1872	0	19	0	19
Salticidae	<i>Icius hamatus</i> (C.L. Koch, 1846)	9	2	5	16
Oecobiidae	<i>Oecobius maculatus</i> Simon, 1870	8	2	2	12
Cyrtachaeniidae	<i>Cyrtachaenius walckenaeri</i> (Lucas, 1846)	5	7	0	12
Titanoecidae	<i>Titanoeca hispanica</i> Wunderlich, 1994	4	3	2	9
Theridiidae	<i>Enoplognatha oelandica</i> (Thorell, 1875)	0	3	5	8
Gnaphosidae	<i>Haplodrassus severus</i> (L. Koch, 1839)	0	5	1	6
Eresidae	<i>Eresus niger</i> (Petagna, 1787)	1	2	2	5
Pisauridae	<i>Pisaura mirabilis</i> (Clerck, 1757)	1	3	1	5
Zodariidae	<i>Zodarion styliferum</i> (Simon, 1870)	0	0	5	5
Gnaphosidae	<i>Nomisia exornata</i> (C.L. Koch, 1839)	3	1	0	4
Lycosidae	<i>Alopecosa</i> sp.	2	2	0	4
Sicariidae	<i>Loxocoles rufescens</i> (Dufour, 1820)	2	0	2	4
Gnaphosidae	<i>Micaria coarctata</i> (Lucas, 1846)	3	0	1	4
Linyphiidae	<i>Pelecopsis bucephala</i> (O.P. Cambridge, 1875)	4	0	0	4
Theridiidae	<i>Steatoda albomaculata</i> (De Geer, 1778)	0	4	0	4
Salticidae	<i>Thyene imperialis</i> (Rossi, 1846)	2	1	0	3
Linyphiidae	<i>Erigone vagans</i> Audouin, 1826	2	1	0	3
Salticidae	<i>Talavera aequipes</i> (O.P. Cambridge, 1871)	1	0	1	2
Salticidae	<i>Chalcocirtus infimus</i> (Simon, 1868)	1	1	0	2
Miturgidae	<i>Cheiracanthium mildei</i> L. Koch, 1874	0	1	0	1
Linyphiidae	<i>Linyphiidae</i> sp.	1	0	0	1
Sparassidae	<i>Olios argelasius</i> (Walckenaer, 1805)	0	1	0	1
Salticidae	<i>Pseudeuophrys lanigera</i> (Simon, 1871)	1	0	0	1
Zodariidae	<i>Zodarion maculatum</i> (Simon, 1870)	0	0	1	1
<b>Número total de individuos (N)</b>		<b>3.102</b>	<b>1.115</b>	<b>899</b>	<b>5.116</b>
<b>Número total de especies (S)</b>		<b>43</b>	<b>43</b>	<b>38</b>	<b>51</b>

**Tabla 2.1** Número total de arañas del suelo capturadas con trampas de gravedad en tres parcelas de cítricos de la provincia de Valencia durante tres años de muestreos.

Parcela	Año	T1 vs T2	T1 vs T3	T1 vs T4	T2 vs T3	T2 vs T4	T3 vs T4
<b>Bétera</b>	1	0,0007	<0,0001	1,0000	<0,0001	0,0006	<0,0001
	2	<0,0001	<0,0001	0,0007	<0,0001	0,0008	<0,0001
	3	<0,0001	<0,0001	0,0298	0,2707	0,0016	0,2683
<b>Olocau</b>	1	0,0218	<0,0001	0,0119	0,0767	1,0000	0,1289
	2	0,1119	0,0002	0,0048	0,1829	1,0000	1,0000
	3	<0,0001	<0,0001	1,0000	1,0000	<0,0001	<0,0001
<b>Náquera</b>	1	0,4398	<0,0001	0,0056	0,0074	0,4920	0,4548
	2	0,0025	<0,0001	0,3759	0,0872	0,3175	0,0005
	3	<0,0001	<0,0001	0,3568	1,0000	0,0033	0,0019

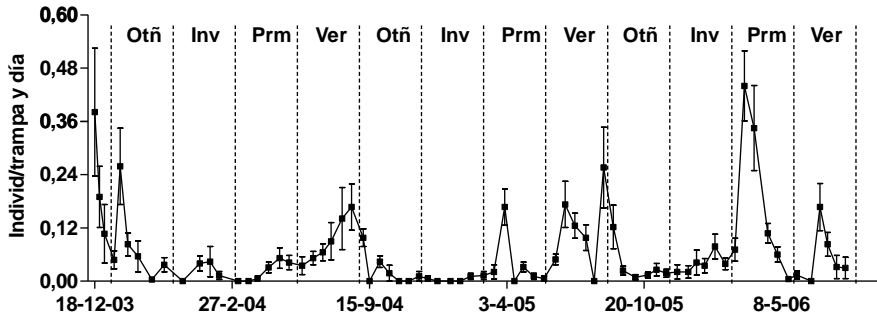
**Tabla 2.2** Valores de *P* del análisis de comparación por pares de datos entre estaciones (T1: invierno; T2: primavera; T3: verano; T4: otoño) del número de arañas recogidas por trampa (Modelo lineal mixto generalizado con medidas repetidas). Las áreas sombreadas corresponden a diferencias estadísticas en el análisis.



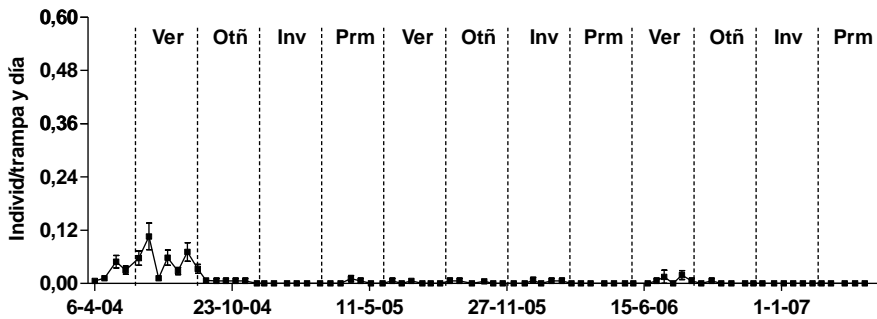
**Figura 2.4** Promedio de adultos de araña capturados por trampa, para cada estación, en cada uno de los tres años del estudio y en las tres parcelas muestreadas: **A)** Bétera, **B)** Olocau y **C)** Náquera.



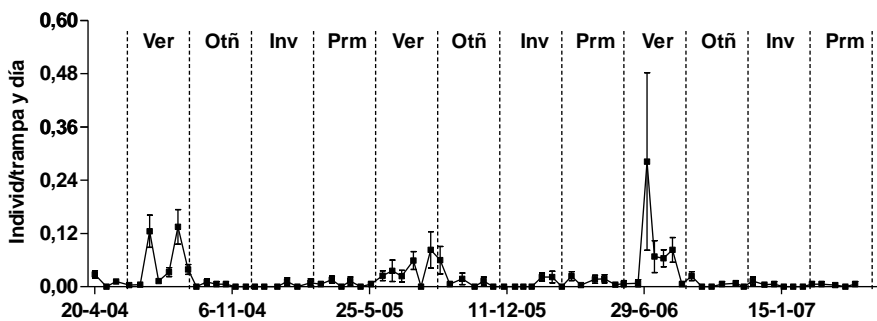
A)



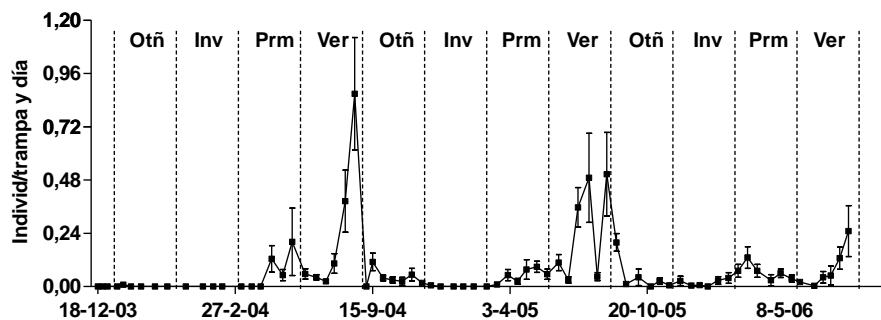
B)



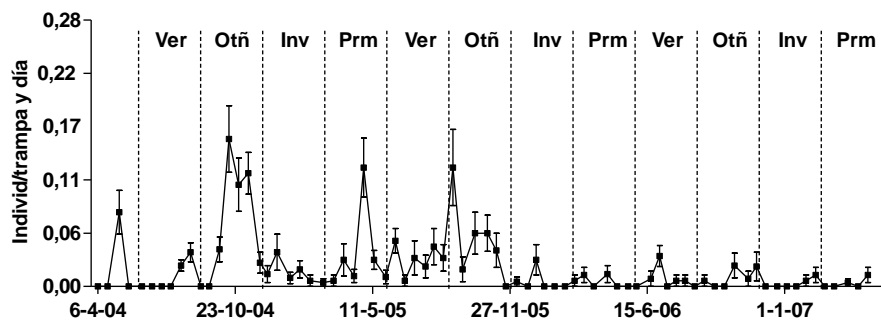
C)



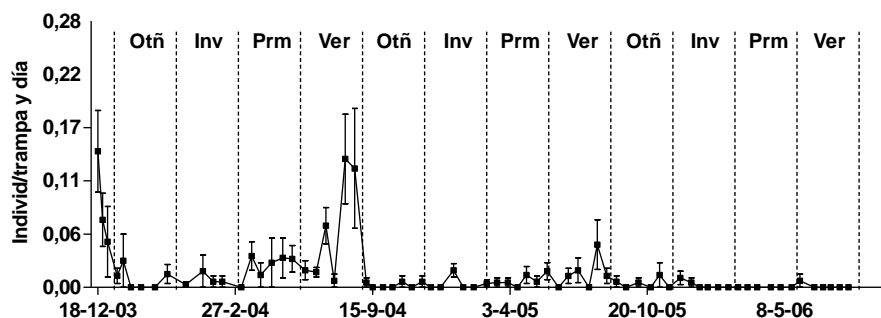
**Figura 2.5** Número medio de especímenes de *P. cribata* (individuos/trampa y día  $\pm$  ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en tres huertos de cítricos sometidos a diferente manejo de la cubierta vegetal: **A)** Bétera (cubierta espontánea), **B)** Olocau (cubierta monoespecífica de *F. arundinacea*) y **C)** Náquera (suelo desnudo). Las estaciones climáticas han sido diferenciadas y marcadas (Otñ: Otoño, Inv: Invierno, Prm: Primavera, Ver: Verano).



**Figura 2.6** Número medio de especímenes de *Zodarion* sp. (individuos/trampa y día  $\pm$  ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en la parcela de Bétera (cubierta espontánea).



**Figura 2.7** Número medio de especímenes de *T. fuscipes* (individuos/trampa y día  $\pm$  ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en la parcela de Olocau (cubierta monoespecífica de *F. arundinacea*).



**Figura 2.8** Número medio de especímenes de *A. perita* (individuos/trampa y día  $\pm$  ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en la parcela de Bétera (cubierta espontánea).

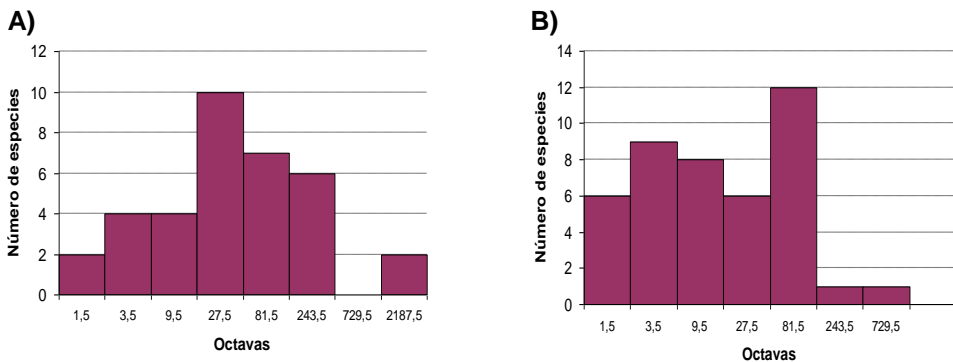
### 2.3.2.3 Indicadores de estructura poblacional

Los datos de abundancia relativa de los grupos de arañas de los tres huertos muestreados se ajustaron a los modelos Log-normal y series logarítmicas de Fisher. En cambio, ninguno de ellos se ajustó al modelo de series geométricas (**Tabla 2.3**). Las tres distribuciones presentaron una moda fuera de la primera octava, con distribuciones tipo log-normal bastante evidentes en Bétera y Náquera (**Fig. 2.9**).

	log-normal		Series log		Series geométricas	
	D <sub>0.05</sub>	D	D <sub>0.05</sub>	D	D <sub>0.05</sub>	D
<b>Bétera</b>	0.136	0.046	0.136	0.038	0.136	0.2989*
<b>Olocau</b>	0.136	0.119	0.136	0.097	0.136	0.1377*
<b>Náquera</b>	0.145	0.043	0.145	0.118	0.145	0.1934*

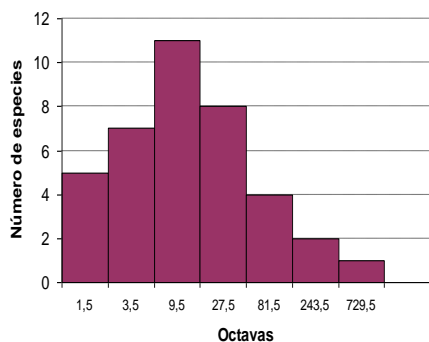
*Los valores críticos han sido calculados para un nivel de significación de 0,05. Valores observados de D por encima del valor crítico (D<sub>0.05</sub>) implican que la distribución observada y la teórica son estadísticamente diferentes (\*).*

**Tabla 2.3** Test estadístico de Kolmogorov-Smirnov para el ajuste de los datos de abundancia de los tres grupos de arañas muestreados a los modelos teóricos de distribución: log-normal, series logarítmicas y series geométricas.



**Figura 2.9** Distribuciones de abundancia de arañas en las parcelas muestreadas de **A) Bétera** y **B) Olocau**. Los datos de abundancia se han dividido en octavas utilizando una escala log3 y con límites superior de cada clase 1,5; 3,5; 9,5;... respectivamente.

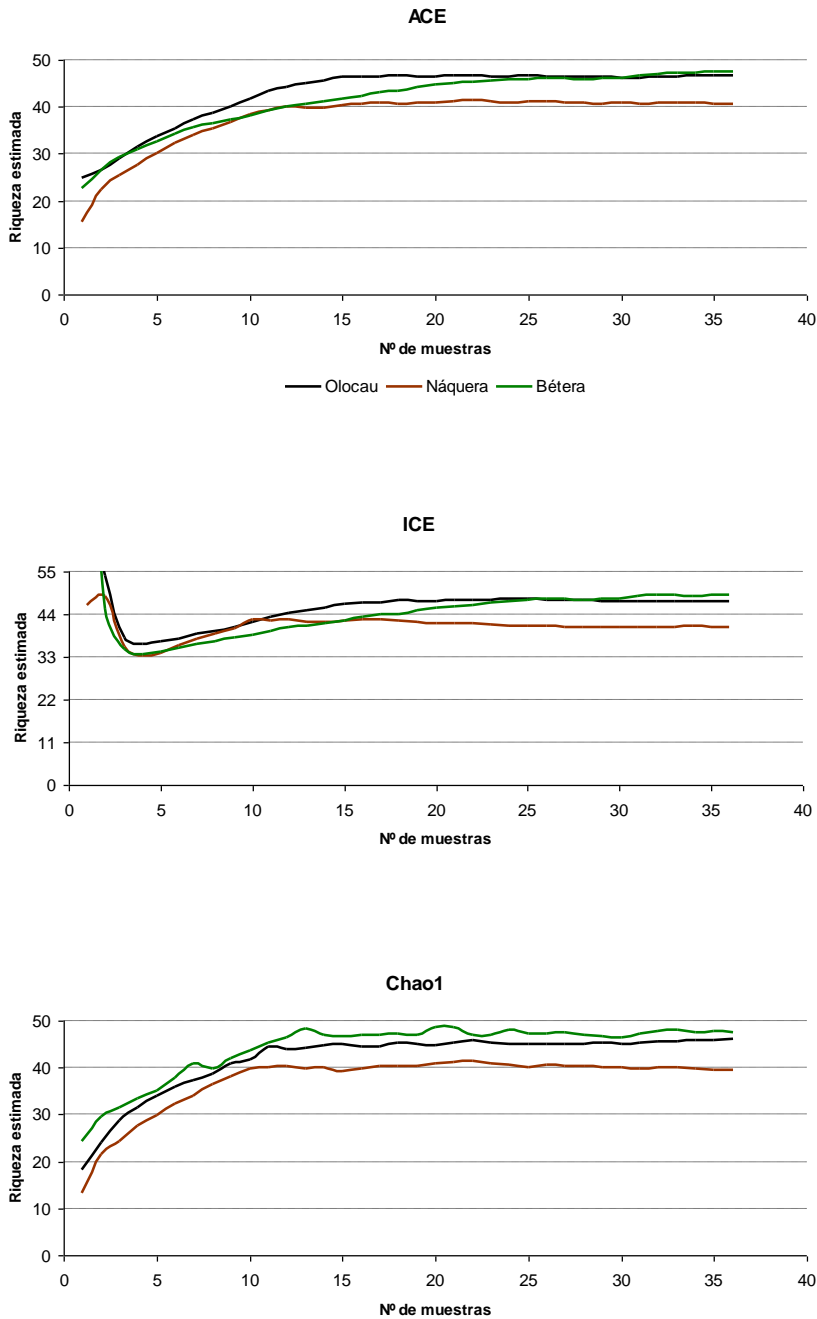
C)



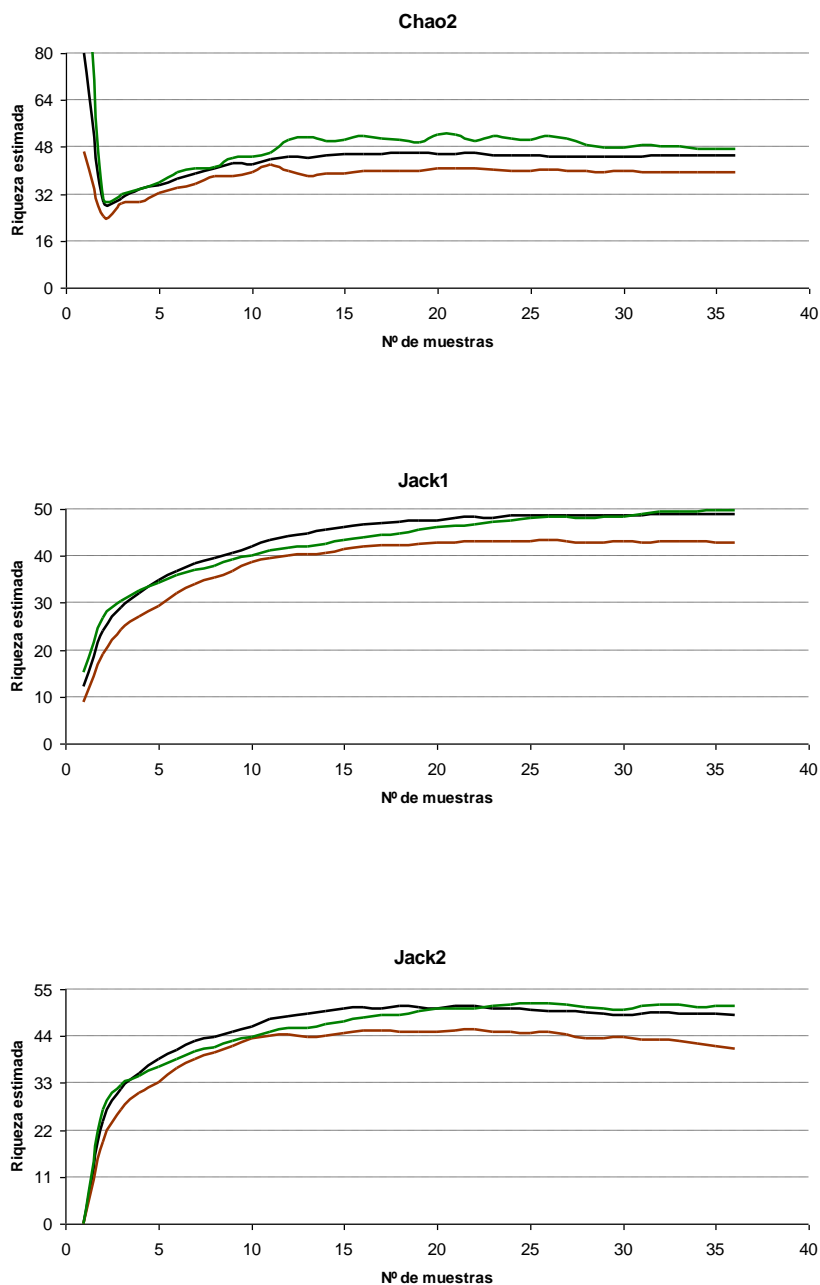
**Figura 2.9 (cont)** Distribución de abundancia de arañas en la parcela de **C) Náquera**. Los datos de abundancia se han dividido en octavas utilizando una escala  $\log_3$  y con límites superior de cada clase 1,5; 3,5; 9,5;... respectivamente.

#### 2.3.2.4 Estimación de la riqueza de especies

Los índices no paramétricos ACE, ICE, Chao1, Chao2, Jack1 y Jack2 produjeron estimaciones estables de la riqueza de especies, que apenas se incrementaban con la adición de nuevas muestras (**Fig. 2.10**). Todos estos índices junto con el estimador paramétrico  $S^*$ , obtenido de la distribución log-normal, generaron valores bastante similares entre ellos y no mucho mayores al número de especies encontrado (**Tabla 2.4**). Bétera y Olocau produjeron los valores de riqueza más elevados para todos los índices utilizados (entre 47,1 - 50,9 especies en Bétera, y 45,1 - 49,0 en Olocau). El grupo de arañas de Náquera fue el que obtuvo una estimación de riqueza más baja (entre 39,2 - 42,9 especies esperadas). El muestreo más completo se obtuvo en Náquera, según el número de especies observadas y el número de especies estimadas. Por otro lado, Bétera, a pesar de ser la parcela donde más individuos se capturaron, es el que presentó un muestreo más incompleto.



**Figura 2.10** Valores promedios estimados de la riqueza de especies en las tres parcelas muestreadas, utilizando los índices ACE, ICE y Chao1 para cada incremento de muestras en el análisis y con 50 reordenaciones aleatorias del orden de entrada de éstas.



**Figura 2.10 (cont.)** Valores promedios estimados de la riqueza de especies en las tres parcelas muestreadas, utilizando los índices Chao2, Jackknife1 y Jackknife2, para cada incremento de muestras en el análisis y con 50 reordenaciones aleatorias del orden de entrada de éstas.

	Bétera			Olocau			Náquera		
	Valor $\pm$ DS	IC <sub>inf</sub>	IC <sub>sup</sub>	Valor $\pm$ DS	IC <sub>inf</sub>	IC <sub>sup</sub>	Valor $\pm$ DS	IC <sub>inf</sub>	IC <sub>sup</sub>
Riqueza obs.	43			43			38		
ACE	47,4			46,6			40,6		
ICE	49,1			47,3			40,6		
Chao1	47,5	43,8	67,9	46,0	43,5	61,0	39,4	38,2	48,6
Chao2	47,1	43,8	63,7	45,1	43,3	56,1	39,2	38,2	47,3
Jack1	49,8 $\pm$ 3,1			48,8 $\pm$ 2,2			42,9 $\pm$ 2,1		
Jack2	50,9			49,0			41,2		
S*	47,5			45,6			40,4		

**Tabla 2.4** Riqueza en especies de arañas estimada en las tres parcelas muestreadas. En algunos índices también se ha representado la desviación estándar (DS) o los intervalos de confianza (IC).

## 2.3.3 Estafilínidos

### 2.3.3.1 Composición de especies y abundancia relativa

Durante los tres años de muestreo se recolectaron 7.007 estafilínidos adultos agrupados en 34 especies diferentes. Las dos especies más capturadas fueron *Atheta (Xenota) mucronata* Kraatz y *Anotylus inustus* (Gravenhorst) (**Fig. 2.28**) con 2.993 y 1.617 individuos respectivamente, suponiendo entre ambas el 66% del total de capturas de esta familia (**Tabla 2.5**). Estas especies aparecieron en una elevada frecuencia en las tres parcelas muestreadas siendo en todos ellos las especies dominantes de este grupo de depredadores. *Ocypus (Ocypus) olens* (Muller), un estafilínido depredador de gran tamaño, fue la tercera especie más capturada en Bétera (155 individuos).

Especie	Bétera	Olocau	Náquera	Total
<i>Atheta (Xenota) mucronata</i> Kraatz, 1859	678	1.893	422	2.993
<i>Anotylus inustus</i> (Gravenhorst, 1806)	188	1.145	284	1.617
<i>Platystethus (Craetopycrus) cornutus</i> (Gravenhorst 1802)	106	254	108	468
<i>Phloenopus minimus</i> Erichson, 1839	3	327	39	369
<i>Oxypoda (Sphenoma) abdominalis</i> Mannerheim, 1831	128	142	24	294
<i>Gauropterus fulgidus</i> (Fabricius, 1787)	84	131	43	258
<i>Ocypus (Ocypus) olens</i> (Muller, 1764)	155	37	54	246
<i>Oligota punctulata</i> Heer, 1859	105	34	49	188
<i>Tasgius (Parastagius) ater</i> (Gravenhorst, 1802)	14	111	5	130
<i>Lepidophallus hesperius</i> (Erichson, 1839)	12	54	24	90
<i>Cordalia obscura</i> (Gravenhorst, 1802)	71	5	9	85
<i>Tachyporus nitidulus</i> (Fabricius, 1781)	62	18	2	82
<i>Holotrochus hispanicus</i> n.sp	51	3	3	57
<i>Tachyporus hypnorum</i> Fabricius, 1775	21	10	1	32
<i>Hydrosmeeta thinobioides</i> (Kraatz, 1854)	3	0	25	28
<i>Acrotona pygmaea</i> (Gravenhorst, 1802)	16	2	1	19
<i>Platystethus nitens</i> (Sahlberg, 1832)	0	8	2	10
<i>Cypha (= Hypocyphus) laeviuscula</i> Mannerheim, 1830	6	1	1	8
<i>Carpellimus (Trogophloeus) gracilis</i> (Mannerheim, 1830)	1	3	1	5
<i>Neobisnius procerulus</i> (Gravenhorst, 1806)	2	0	3	5
<i>Stenus (Parastenus) impressus</i> Germar, 1824	0	0	4	4
<i>Scopaeus debilis</i> Hochhuth, 1851	0	3	0	3
morfoespecie 1	0	2	0	2
<i>Lordithon (Lordithon) exoletus</i> (Erichson, 1839)	0	2	0	2
morfoespecie 2	0	0	2	2
morfoespecie 3	0	0	2	2
<i>Alaobia scapularis</i> (Sahlberg, 1831)	0	1	0	1
<i>Hypomedon debilicornis</i> (Wollaston, 1857)	1	0	0	1
<i>Gabrius nigrifolius</i> (Gravenhorst, 1802)	0	1	0	1
<i>Philonthus varians</i> (Paykull, 1789)	0	1	0	1
<i>Quedius simplicifrons</i> Fairmaire, 1862	0	0	1	1
<i>Xantholinus elegans</i> (Olivier, 1795)	0	0	1	1
morfoespecie 4	0	0	1	1
morfoespecie 5	1	0	0	1
<b>Número total de individuos (N)</b>	<b>1.708</b>	<b>4.188</b>	<b>1.111</b>	<b>7.007</b>
<b>Número total de especies (S)</b>	<b>21</b>	<b>24</b>	<b>26</b>	<b>34</b>

**Tabla 2.5** Número total de estafilínidos capturados con trampas de gravedad en tres parcelas de cítricos de la provincia de Valencia durante tres años de muestreos.

### 2.3.3.2 Patrones de actividad-densidad

Los estafilínidos aparecieron durante todo el año en las tres parcelas muestreadas. Se dieron diferencias significativas en el número de capturas entre los distintos años de muestreo, en las 3 parcelas ( $P < 0,0001$  en Bétera,  $P < 0,0001$  en Olocau y  $P = 0,0239$  en Náquera). En el análisis de la actividad estacional de este grupo, también aparecieron diferencias significativas entre las distintas estaciones del año ( $P = 0,0338$  en Bétera,  $P < 0,0001$  en Olocau y  $P < 0,0001$  en Náquera) (**Fig. 2.11**). En todas las parcelas se detectó una clara interacción entre el año de muestreo y la estación ( $P < 0,0001$  en Bétera,  $P < 0,0001$  en Olocau y  $P = 0,0014$  en Náquera) por lo que fue imposible describir una patrón de comportamiento estacional común para



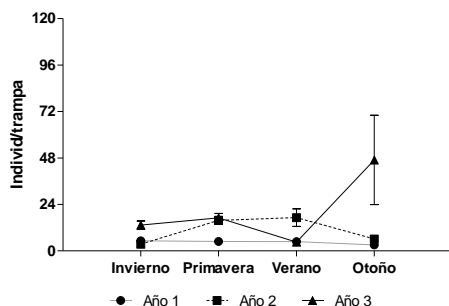
este grupo (**Tabla 2.6**). En general la actividad más baja se registró en invierno. Cabe destacar que en las tres parcelas, hubo años con picos poblacionales destacados en otoño (**Fig. 2.11**).

El análisis individualizado de las dinámicas estacionales de las especies más abundantes revela un patrón de comportamiento más regular tanto entre parcelas como entre estaciones (**Fig. 2.12, 2.13 y 2.14**), con el matiz de encontrar con frecuencia explosiones poblacionales en un determinado año y parcela que no tienen por qué repetirse en las otras temporadas ni tampoco en los otros puntos de muestreo. Los máximos poblacionales de *A. mucronata* se dieron en verano, con picos secundarios tanto en otoño como en primavera. *Anotylus inustus* presentó dos picos de actividad al año, uno en primavera y otro en otoño. Los máximos poblacionales de *O. olens* se dieron en otoño y su actividad se prolongó durante toda la estación fría.

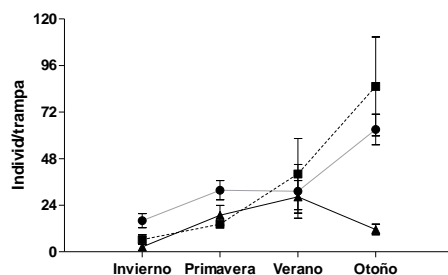
Parcela	Año	T1 vs T2	T1 vs T3	T1 vs T4	T2 vs T3	T2 vs T4	T3 vs T4
<b>Bétera</b>	<b>1</b>	1,0000	1,0000	0,6642	1,0000	0,9908	1,0000
	<b>2</b>	<0,0001	<0,0001	0,3417	1,0000	0,0066	0,0057
	<b>3</b>	1,0000	0,0979	0,0384	0,0236	0,1502	<0,0001
<b>Olocau</b>	<b>1</b>	0,4941	0,5448	0,0050	1,0000	0,4557	0,4120
	<b>2</b>	0,0890	0,0003	<0,0001	0,2598	0,0001	0,0010
	<b>3</b>	<0,0001	<0,0001	0,0001	0,9758	1,0000	0,0907
<b>Náquera</b>	<b>1</b>	0,0368	0,0457	0,0080	1,0000	1,0000	1,0000
	<b>2</b>	0,0026	<0,0001	<0,0001	1,0000	1,0000	1,0000
	<b>3</b>	1,0000	0,1202	1,0000	0,0210	1,0000	0,0244

**Tabla 2.6** Valores de *P* del análisis de comparación por pares de datos entre estaciones (T1: invierno; T2: primavera; T3: verano; T4: otoño) del número de estafilínidos por trampa (Modelo lineal mixto generalizado con medidas repetidas). Las áreas sombreadas corresponden a diferencias estadísticas en el análisis.

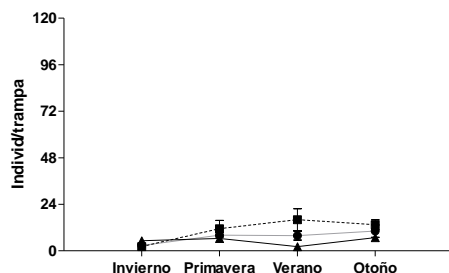
A)



B)

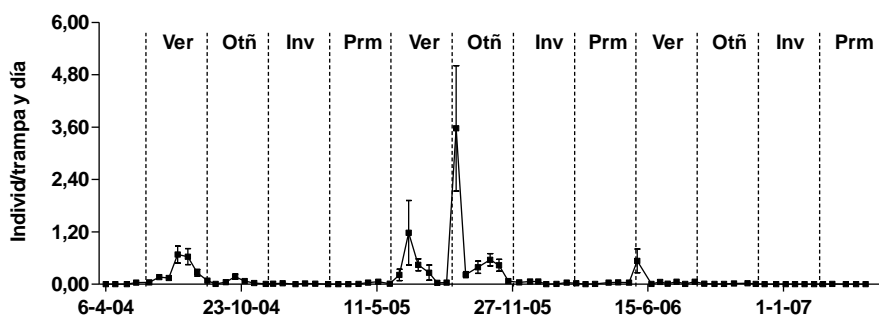


C)



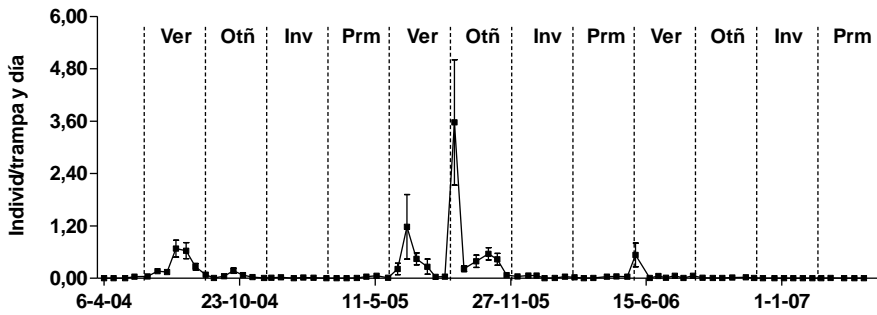
**Figura 2.11** Promedio de adultos de estafilínidos capturados por trampa, para cada estación, en cada uno de los tres años del estudio y en las tres parcelas muestreadas: **A)** Bétera, **B)** Olocau y **C)** Náquera.

A)



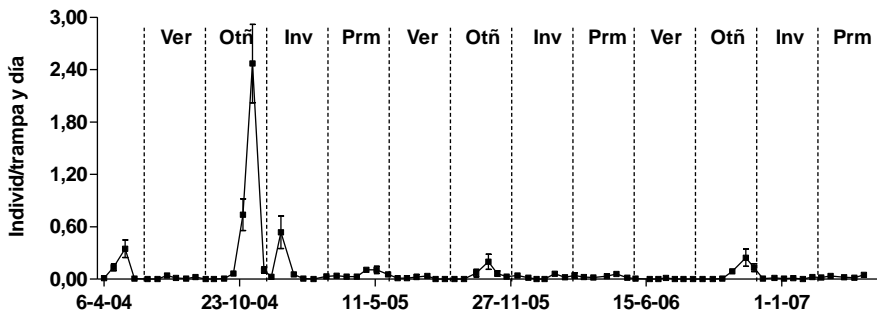
**Figura 2.12** Número medio de especímenes de *A. mucronata* (individuos/trampa y día  $\pm$  ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en **A)** Olocau (cubierta monoespecífica de *F. arundinacea*). Las estaciones climáticas han sido diferenciadas y marcadas (Otñ: Otoño, Inv: Invierno, Prm: Primavera, Ver: Verano).

B)

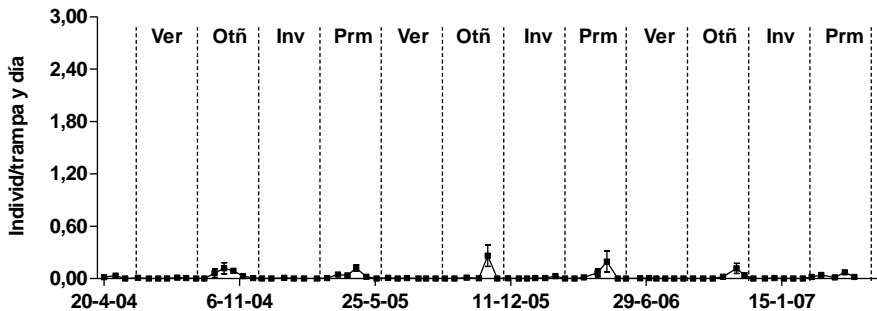


**Figura 2.12 (cont.)** Número medio de especímenes de *A. mucronata* (individuos/trampa y día  $\pm$  ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años **B)** Bétera (cubierta espontánea).

A)

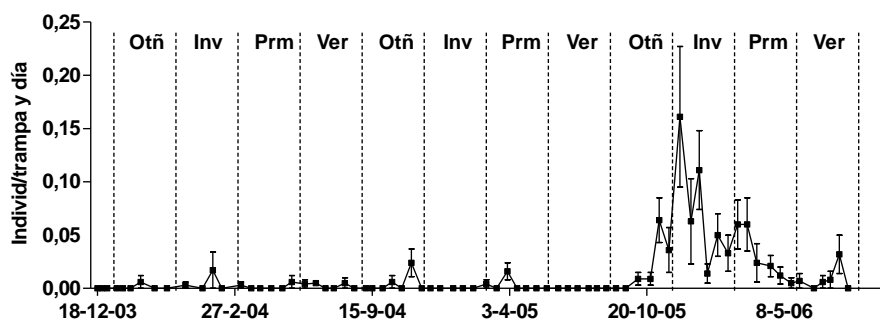


B)

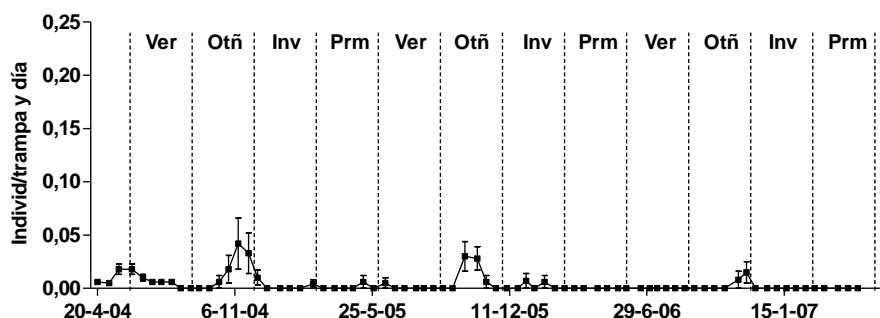


**Figura 2.13** Número medio de especímenes de *A. inustus* (individuos/trampa y día  $\pm$  ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en **A)** Olocau (cubierta monoespecífica de *F. arundinacea*) y **B)** Náquera (suelo desnudo).

A)



B)



**Figura 2.14** Número medio de especímenes de *O. olens* (individuos/trampa y día  $\pm$  ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en **A)** Bétera (cubierta espontánea) y **B)** Náquera (suelo desnudo).

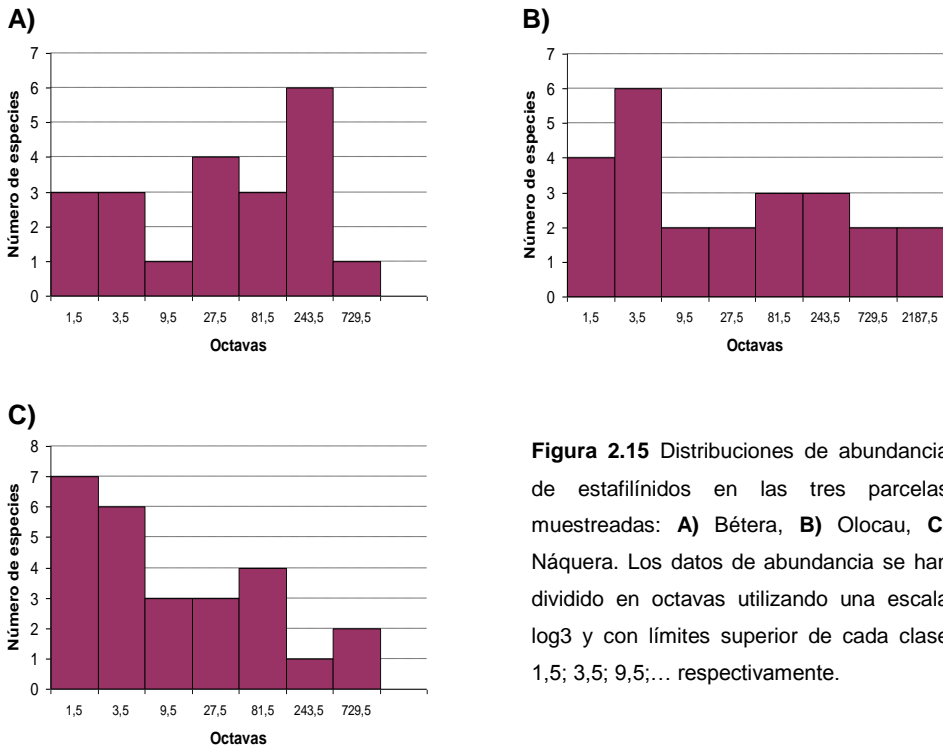
### 2.3.3.3 Indicadores de estructura poblacional

Como ninguna de las tres distribuciones asemejaba al modelo log-normal (distribución normal con una moda más o menos centrada), de hecho, en Olocau y Náquera la moda se dio en las dos primeras octavas, mientras que en Bétera ésta aparecía aislada en la penúltima octava (**Fig. 2.15**), el ajuste de datos se realizó con los modelos teóricos de las series logarítmicas y las series geométricas. Los tres grupos de estafilínidos muestreados ajustaron al modelo de las series logarítmicas. El grupo de Bétera también ajustó a la distribución teórica de las series geométricas (**Tabla 2.7**).

	Series logarítmicas		Series geométricas	
	$D_{0.05}$	D	$D_{0.05}$	D
<b>Bétera</b>	0,287	0,195	0,193	0,133
<b>Olocau</b>	0,269	0,190	0,181	0,269*
<b>Náquera</b>	0,259	0,152	0,174	0,285*

Los valores críticos han sido calculados para un nivel de significación de 0,05. Valores observados de D por encima del valor crítico ( $D_{0.05}$ ) implican que la distribución observada y la teórica son estadísticamente diferentes (\*).

**Tabla 2.7** Test estadístico de Kolmogorov-Smirnov para el ajuste de los datos de abundancia de los tres grupos de estafilínidos muestreados a los modelos teóricos de distribución: log-normal, series logarítmicas y series geométricas.



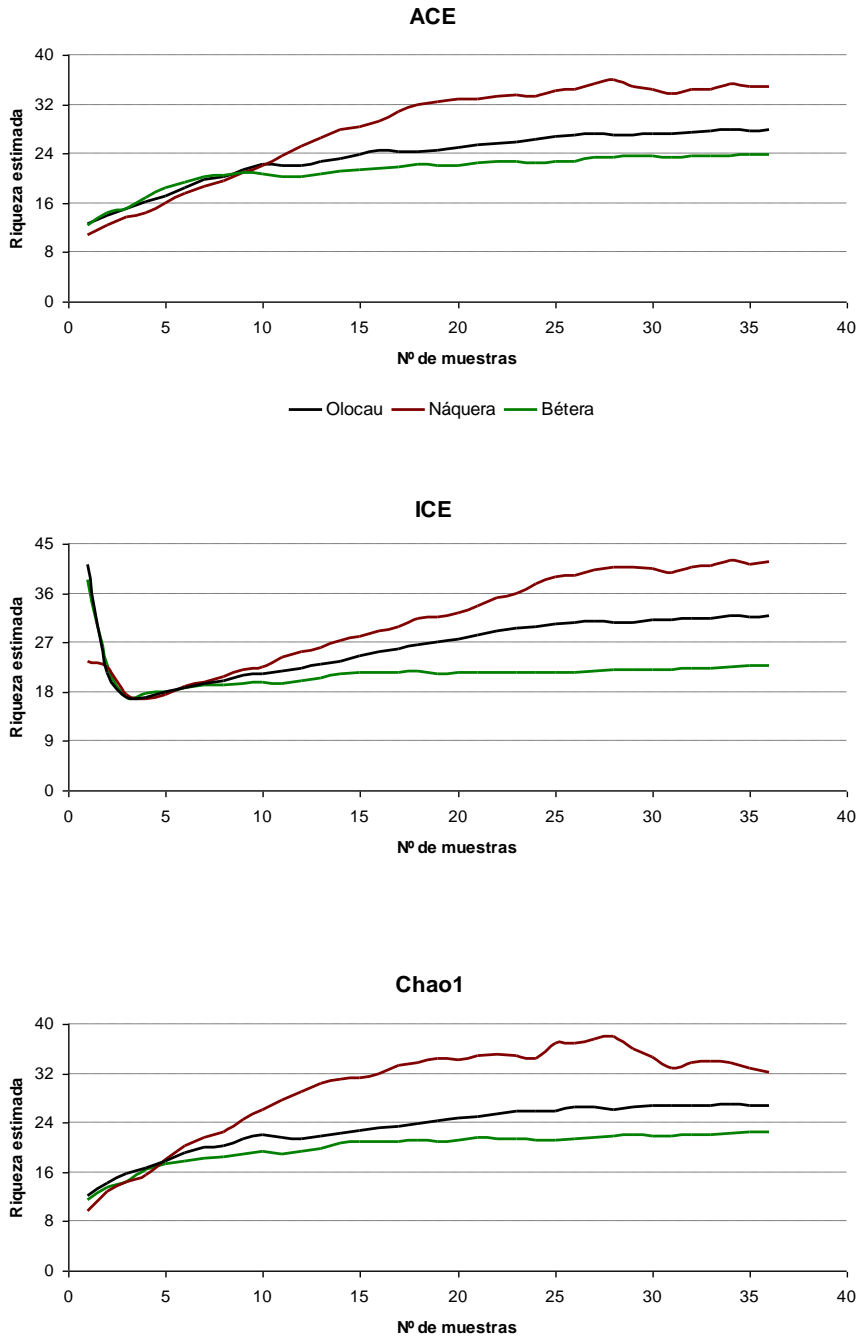
**Figura 2.15** Distribuciones de abundancia de estafilínidos en las tres parcelas muestreadas: **A)** Bétera, **B)** Olocau, **C)** Náquera. Los datos de abundancia se han dividido en octavas utilizando una escala log3 y con límites superior de cada clase 1,5; 3,5; 9,5;... respectivamente.

### 2.3.3.4 Estimación de la riqueza de especies

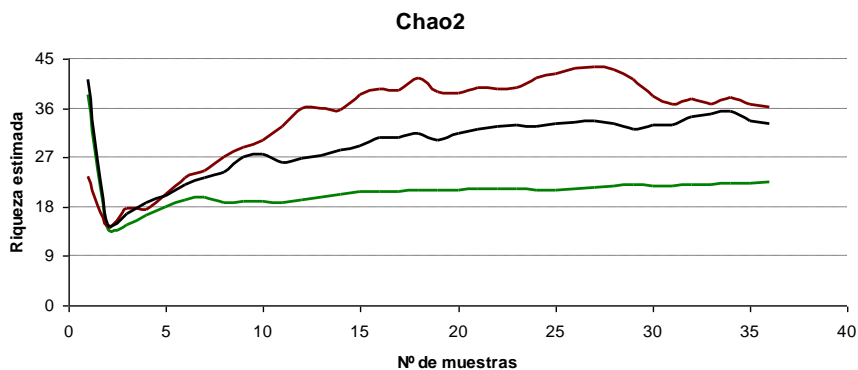
La estabilidad de los valores de riqueza estimados al ir incrementando el número de muestras fue diferente en función del índice utilizado y de la parcela muestreada (**Fig. 2.16**). Los valores más estables se obtuvieron en Bétera. Además, en esta parcela se estimó un número de especies teórico bastante similar al que se registró con los muestreos (21 especies encontradas y entre 22-24 estimadas) (**Tabla 2.8**). Por otro lado, los distintos índices utilizados mostraron poca robustez al analizar los datos de la parcela de Náquera. En ésta, los índices ACE y ICE mantienen una tendencia a ir incrementando el valor estimado cuando ya se ha añadido toda la información de la que disponemos, y los valores de Chao1 y Chao2 varían mucho en función de la cantidad de información que se esté utilizando. Además, en esta parcela el número de especies observado (26 especies), fue bastante inferior al estimado (entre 32 y 42 especies) (**Tabla 2.8**). En Olocau, los índices ACE y Chao1 produjeron los valores más estables. La riqueza estimada en esta parcela fue entre 4 y 9 especies superior a la registrada.

	Bétera			Olocau			Náquera		
	Valor	IC inf	IC sup	Valor	IC inf	IC sup	Valor	IC inf	IC sup
<b>Riqueza obs.</b>	<b>21</b>			<b>24</b>			<b>26</b>		
<b>ACE</b>	<b>23,87</b>			<b>27,96</b>			<b>34,89</b>		
<b>ICE</b>	<b>22,77</b>			<b>31,85</b>			<b>41,61</b>		
<b>Chao1</b>	<b>22,5</b>	21,15	36,08	<b>26,67</b>	24,38	42,86	<b>32,13</b>	27,21	57,04
<b>Chao2</b>	<b>22,46</b>	21,14	35,72	<b>33</b>	25,52	77,28	<b>36,13</b>	28,26	71,28

**Tabla 2.8** Riqueza en especies de estafilínidos estimada en las tres parcelas muestreadas. En los índices Chao1 y Chao2 también se han mostrado los intervalos de confianza (IC).



**Figura 2.16** Valores promedios estimados de la riqueza de especies en las tres parcelas muestreadas, utilizando los índices ACE, ICE y Chao1, para cada incremento de muestras en el análisis y con 50 reordenaciones aleatorias del orden de entrada de éstas.



**Figura 2.16 (cont.)** Valores promedios estimados de la riqueza de especies en las tres parcelas muestreadas, utilizando el índice Chao2, para cada incremento de muestras en el análisis y con 50 reordenaciones aleatorias del orden de entrada de éstas.

## 2.3.4 Carábidos

### 2.3.4.1 Composición de especies y abundancia relativa

Durante los tres años de muestreo se recogieron un total de 2.472 carábidos adultos agrupados en 19 especies distintas. La parcela de Bétera, que mantenía una cubierta de vegetación espontánea, fue la que más capturas registró. De hecho, en esta parcela se recogió el 85% del total de carábidos del estudio (**Tabla 2.9**). La especie *Pseudoophonus (Pseudoophonus) rufipes* (De Geer) (**Fig. 2.28**) fue la más importante en número de capturas (52% del total de carábidos), seguida por *Harpalus (Harpalus) distinguendus* (Duftschmid) que fue la especie más abundante en Náquera y Olocau. Estas dos especies supusieron el 82% del total de capturas realizadas.



Especie	Bétera	Olocau	Náquera	Total
<i>Pseudoophonus (Pseudoophonus) rufipes</i> (De Geer 1774)	1.188	40	51	1.279
<i>Harpalus (Harpalus) distinguendus</i> (Duftschmid, 1812)	599	96	66	761
<i>Amara aenea</i> De Geer, 1774	137	34	3	174
<i>Acinopus picipes</i> (Olivier, 1795)	67	11	0	78
<i>Pseudoophonus (Pseudoophonus) griseus</i> (Panzer, 1796)	32	7	4	43
<i>Licinus punctatulus granulatus</i> Dejean, 1826	34	2	4	40
<i>Cymindis lineola</i> Dufour, 1820	16	2	3	21
<i>Microlestes corticallis</i> (Dufour, 1820)	5	11	1	17
<i>Olistophus</i> sp.	9	1	7	17
<i>Metallina (Neja) ambiguum</i> (Dejean, 1831)	4	6	5	15
<i>Anchomenus dorsalis</i> (Pontoppidan, 1763)	5	4	0	9
<i>Paradromius (Manodromius) linearis</i> (Oliver, 1795)	0	5	1	6
<i>Elaphropus (Tachyura) parvulus</i> (Dejean, 1831)	0	3	0	3
morfoespecie 1	0	2	1	3
<i>Dixus clypeatus</i> (Rossi, 1790)	0	2	0	2
<i>Brachinus (Brachynidius) scolopeta</i> (Fabricius, 1792)	1	0	0	1
<i>Pseudomasoreus canigoulensis</i> (Fairmaire & Laboulbène, 1854)	0	1	0	1
morfoespecie 2	1	0	0	1
morfoespecie 3	0	0	1	1
<b>Número total de individuos (N)</b>	<b>2.098</b>	<b>227</b>	<b>147</b>	<b>2.472</b>
<b>Número total de especies (S)</b>	<b>13</b>	<b>16</b>	<b>12</b>	<b>19</b>

**Tabla 2.9** Número total de carábidos capturados con trampas de gravedad en tres parcelas de cítricos de la provincia de Valencia durante tres años de muestreos.

### 2.3.4.2 Patrones de actividad-densidad

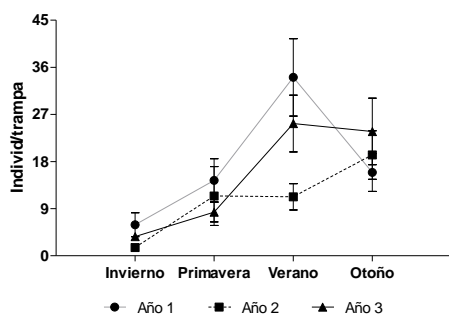
En las tres parcelas muestreadas, aparecieron diferencias significativas en el número de carábidos capturados entre los distintos años del estudio (Bétera,  $P = 0,0009$ ; Olocau,  $P < 0,0001$ ; Náquera,  $P < 0,0001$ ) y también entre las distintas estaciones (Bétera,  $P < 0,0001$ ; Olocau,  $P < 0,0001$ ; Náquera,  $P < 0,0001$ ) (**Fig. 2.17**). Con este grupo de depredadores también se dio una interacción entre año de muestreo y estación. Ésta fue claramente significativa en Náquera ( $P < 0,0001$ ) y en Olocau ( $P = 0,0278$ ), y significativa a un nivel del 10% en Bétera ( $P < 0,745$ ). En general, el mayor número de capturas se obtuvo en verano, con picos secundarios en primavera y otoño dependiendo del sitio y del año de muestreo (**Tabla 2.10**, **Fig. 2.17**).

En el análisis de la actividad estacional de las tres especies más capturadas se puede ver que *P. rufipes* presentó en los tres años dos máximos de actividad marcados, uno a mediados de verano y otro en otoño (**Fig. 2.18**). *H. distinguendus* mostró una actividad moderada desde finales del invierno hasta mediados del otoño, y *Amara aenea* (De Geer) desde finales del invierno a mediados del verano registrándose sus máximos en la primavera.

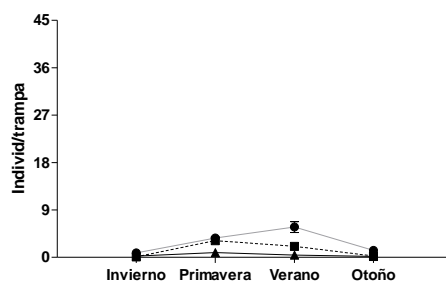
Parcela	Año	T1 vs T2	T1 vs T3	T1 vs T4	T2 vs T3	T2 vs T4	T3 vs T4
<b>Bétera</b>	1	0,0148	<0,0001	0,0089	0,0065	1,0000	0,0106
	2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	1,0000	0,0815	0,9889
	3	0,2669	<0,0001	<0,0001	0,0072	0,0174	1,0000
<b>Olocau</b>	1	0,0008	<0,0001	1,0000	0,2563	0,0082	<0,0001
	2	0,0055	0,0187	1,0000	1,0000	0,0010	0,0091
	3	0,3137	1,0000	1,0000	0,9053	0,1907	1,0000
<b>Náquera</b>	1	—	—	—	<0,0001	1,0000	<0,0001
	2	—	—	—	0,1058	0,1368	1,0000
	3	—	—	—	0,4627	0,4627	1,0000

**Tabla 2.10** Valores de *P* del análisis de comparación por pares de datos entre estaciones (T1: invierno; T2: primavera; T3: verano; T4: otoño) del número de carábidos por trampa (Modelo lineal mixto generalizado con medidas repetidas). Las áreas sombreadas corresponden a diferencias estadísticas en el análisis. Los datos de la estación T1 de Náquera han sido excluidos del análisis ya que T1-año 2 y T1-año 3 no presentaron capturas y por lo tanto no existía variabilidad en estas combinaciones.

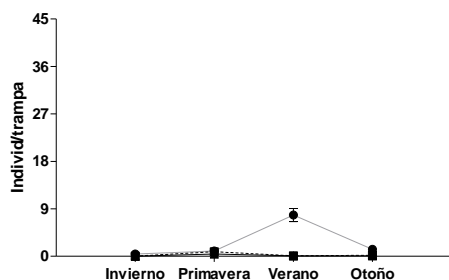
A)



B)

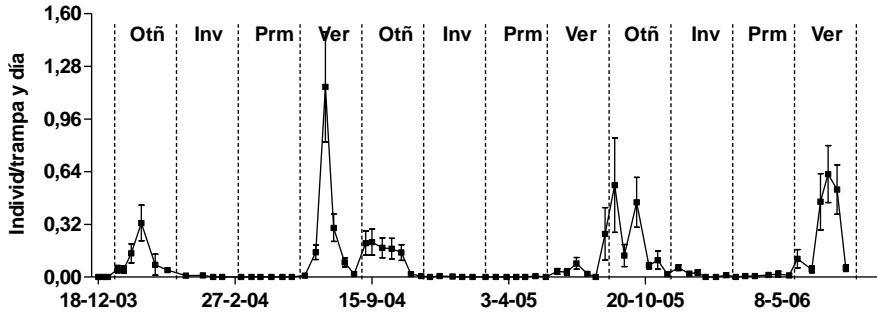


C)

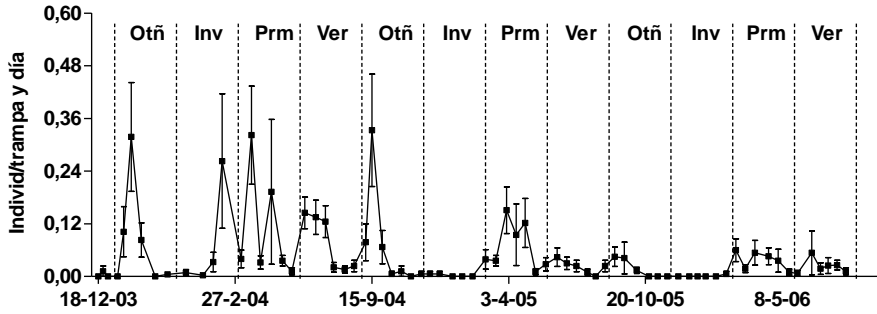


**Figura 2.17** Promedio de adultos de carábidos capturados por trampa, para cada estación, en cada uno de los tres años del estudio y en las tres parcelas muestreadas: **A)** Bétera, **B)** Olocau, **C)** Náquera.

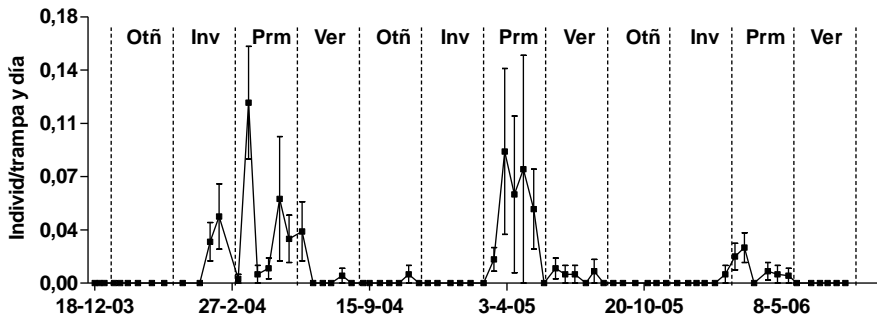
A)



B)



C)



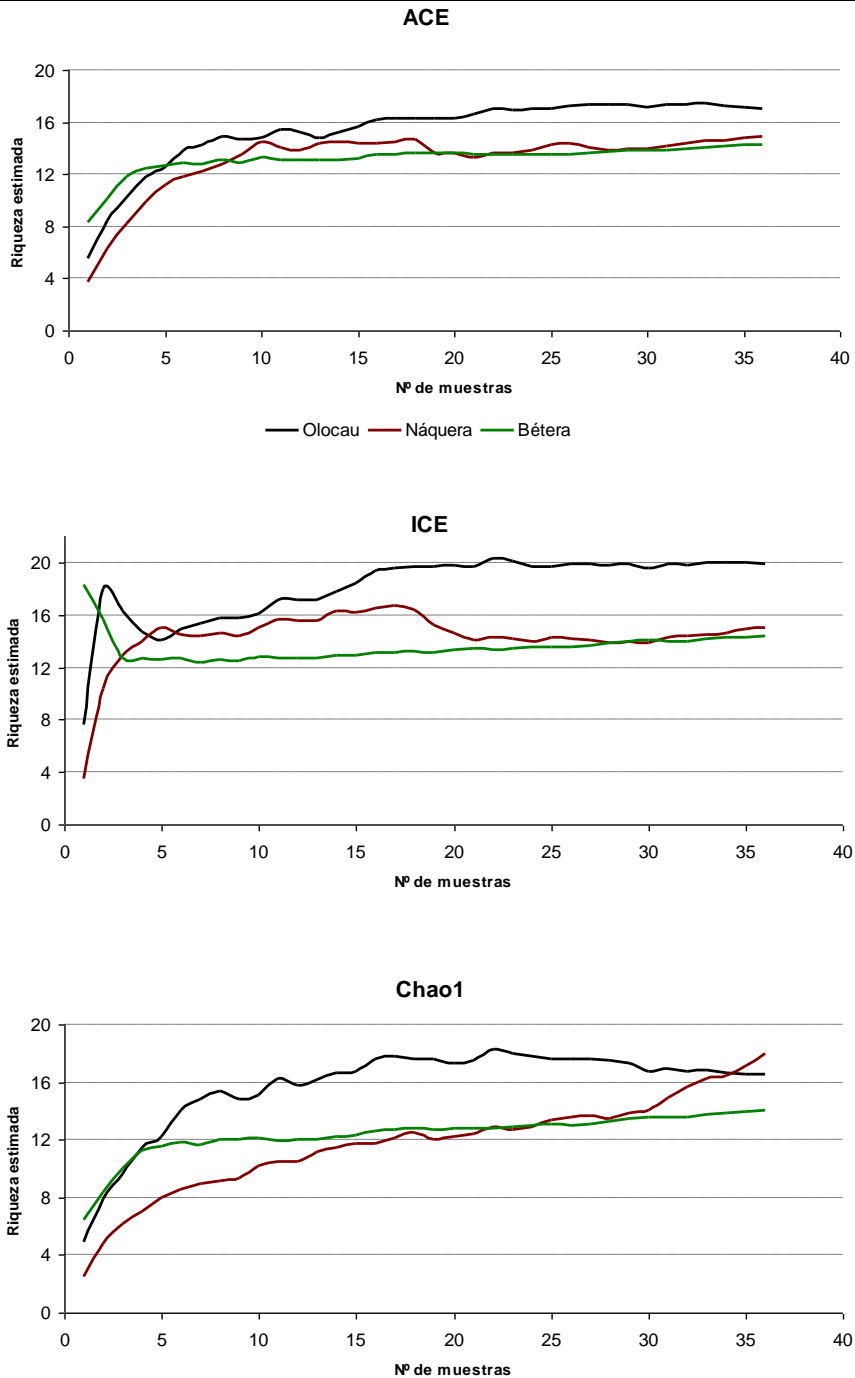
**Figura 2.18** Número medio de especímenes (individuos/trampa y día  $\pm$  ES) de **A)** *P. rufipes*, **B)** *H. distinguendus* y **C)** *A. aenea*, recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en la parcela de Bétera (cubierta espontánea). Las estaciones climáticas han sido diferenciadas y marcadas (Otñ: Otoño, Inv: Invierno, Prm: Primavera, Ver: Verano).

### 2.3.4.3 Estimación de la riqueza de especies

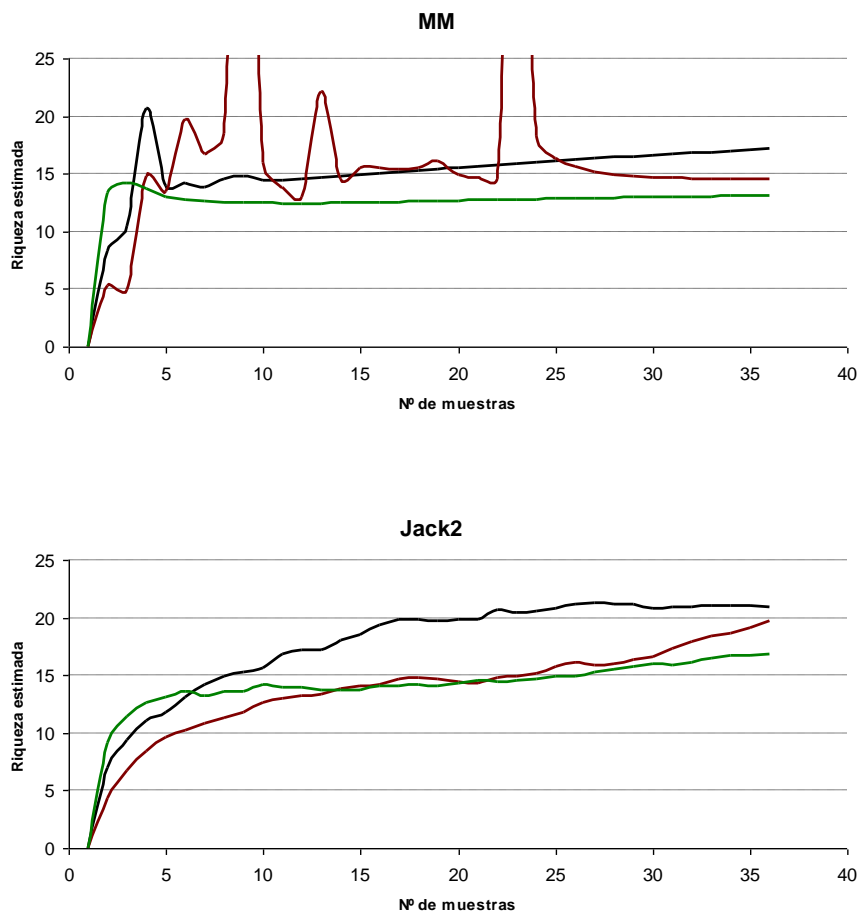
En el grupo de carábidos de Olocau, los índices ACE, ICE, Chao1 y Jack2 dieron estimaciones de la riqueza de especies bastante estables con la adición de nuevas muestras (**Fig. 2.19**). En el grupo de Bétera, los valores más estables se obtuvieron con los índices ACE y MM; los índices ICE y Chao1 también ofrecieron unas estimaciones cercanas a alcanzar un valor asintótico. En Náquera, el valor más estable se dió con el estimador MM, estando también las estimaciones de ACE e ICE cercanas a alcanzar un valor asintótico. La riqueza estimada en Olocau fue entre 1 y 5 especies superior a la registrada mediante los muestreos (**Tabla 2.11**), en Bétera entre 1 y 4 especies, y en Náquera 3 especies superior.

	Bétera			Olocau			Náquera
	Valor	IC inf	IC sup	Valor	IC inf	IC sup	Valor
<b>Riqueza obs.</b>	<b>13</b>			<b>16</b>			<b>12</b>
<b>ACE</b>	14.28			17			14.92
<b>ICE</b>	14.42			19.93			15.03
<b>Chao1</b>	14	13.07	27.14	16.5	16.04	22.24	—
<b>Jack 2</b>	16.83			20.91			—
<b>MM</b>	13.11			—			14.56

**Tabla 2.11** Riqueza en especies de carábidos estimada en las tres parcelas muestreadas. En el índice Chao1 se han representado los intervalos de confianza (IC).



**Figura 2.19** Valores promedios estimados de la riqueza de especies en las tres parcelas muestreadas, utilizando los índices ACE, ICE y Chao1, para cada incremento de muestras en el análisis y con 50 reordenaciones aleatorias del orden de entrada de éstas.



**Figura 2.19 (cont.)** Valores promedios estimados de la riqueza de especies en las tres parcelas muestreadas, utilizando los índices MM y Jack2, para cada incremento de muestras en el análisis y con 50 reordenaciones aleatorias del orden de entrada de éstas.

## 2.3.5 Dermápteros

### 2.3.5.1 Composición de especies y abundancia relativa

Durante los tres años de muestreos se capturaron 2.503 individuos adultos del orden Dermaptera (**Tabla 2.12**). Tan sólo se diferenciaron 4 especies pertenecientes a este grupo de depredadores. De ellas, *Euborellia moesta* (Gené) (**Fig. 2.30**) fue la

especie más abundante con 1.022 individuos recolectados. El 99% de los especímenes de esta especie se recogieron en la parcela de Olocau. *Forficula auricularia* L. fue la segunda especie en número de capturas (895). A diferencia de *E. moesta*, las capturas de esta especie fueron relativamente abundantes en las 3 parcelas muestreadas.

Familia	Especie	Bétera	Olocau	Náquera	Total
Anisolabididae	<i>Euborellia moesta</i> (Gené, 1839)	1	1.013	8	1.022
Forficulidae	<i>Forficula auricularia</i> Linnaeus, 1758	473	226	196	895
Anisolabididae	<i>Euborellia annulipes</i> (Dohrn, 1864)	31	396	18	445
Labiduridae	<i>Labidura riparia</i> (Pallas, 1773)	102	5	34	141
Número total de individuos (N)		607	1.640	256	2.503

**Tabla 2.12** Número total de dermápteros capturados con trampas de gravedad en tres parcelas de cítricos de la provincia de Valencia durante tres años de muestreos.

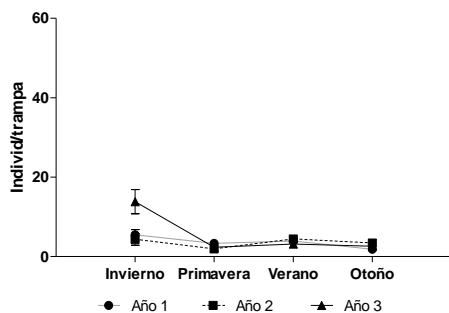
### 2.3.5.2 Patrones de actividad-densidad

Al analizar los datos por parcela, no se encontraron diferencias significativas entre años en el número de dermápteros capturados en Bétera ( $P = 0,2427$ ) pero las hubo en Olocau y Náquera ( $P < 0,0001$ ). En las tres parcelas hubo diferencias significativas en el número de capturas entre estaciones ( $P < 0,0001$  en Bétera y Olocau, y  $P < 0,0760$  en Náquera), y se dio también una interacción entre el año y la estación, especialmente marcada en Olocau y Bétera ( $P < 0,0001$  y  $P = 0,0045$  respectivamente) y con un menor grado de significación en Náquera ( $P = 0,0855$ ). Los dermápteros aparecieron durante todo el año, con picos de actividad en verano e invierno en función de la parcela y el año analizado (Tabla 2.13, Fig. 2.20). *Euborellia moesta* se mostró activa durante todo el año exceptuando la estación fría, registrando su máximo de actividad durante el verano (Fig. 2.21). Se obtuvieron capturas de *F. auricularia* durante todo el año con picos de actividad en el invierno (Fig. 2.22). El mayor número de capturas de *Euborellia annulipes* (Dohrn) se dio durante el verano y el otoño (Fig. 2.23).

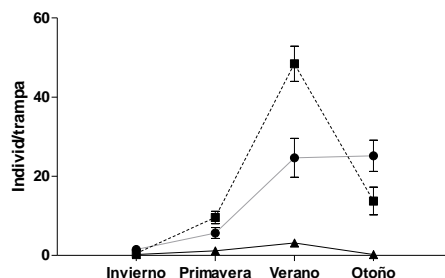
Parcela	Año	T1 vs T2	T1 vs T3	T1 vs T4	T2 vs T3	T2 vs T4	T3 vs T4
Bétera	1	0,8206	1,0000	0,0141	1,0000	0,4847	0,1351
	2	0,1811	1,0000	1,0000	0,0582	0,4770	1,0000
	3	< 0,0001	0,0002	< 0,0001	1,0000	1,0000	1,0000
Olocau	1	0,0051	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	1,0000
	2	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,9873	< 0,0001
	3	0,1179	0,0007	1,0000	0,0156	0,1179	0,0007
Náquera	1	0,4928	0,0006	1,0000	0,0624	0,2955	0,0003
	2	1,0000	0,1655	0,9852	1,0000	1,0000	1,0000
	3	0,9025	1,0000	0,4600	1,0000	1,0000	1,0000

**Tabla 2.13** Valores de *P* del análisis de comparación por pares de datos entre estaciones (T1: invierno; T2: primavera; T3: verano; T4: otoño) del número de dermápteros por trampa (Modelo lineal mixto generalizado con medidas repetidas). Las áreas sombreadas corresponden a diferencias estadísticas en el análisis.

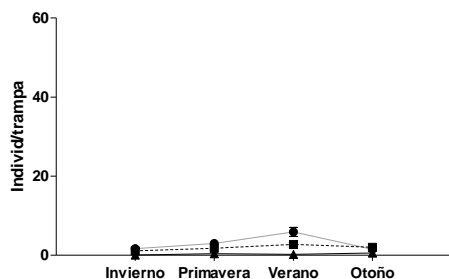
A)



B)

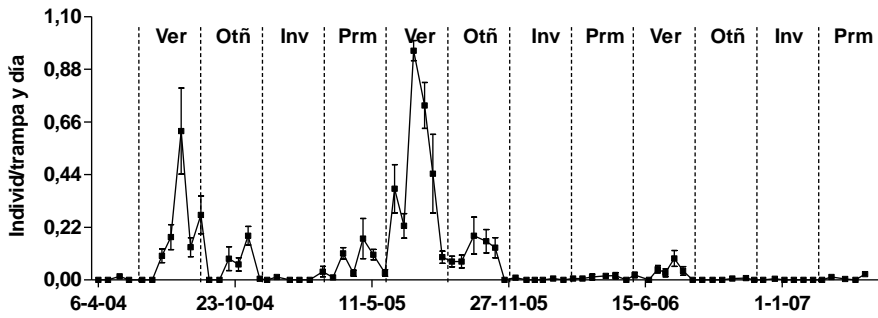


C)

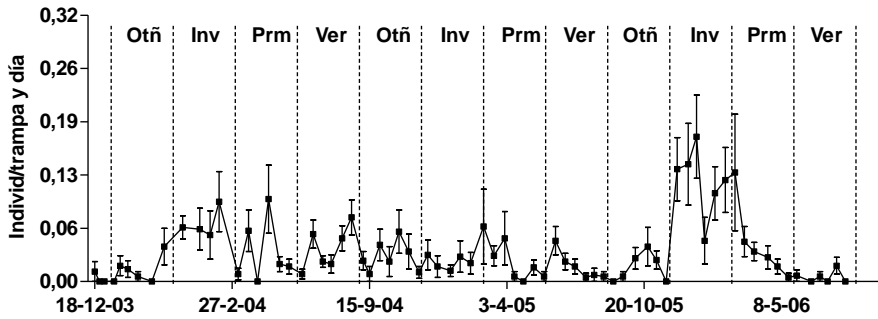


**Figura 2.20** Promedio de adultos de dermápteros capturados por trampa, para cada estación, en cada uno de los tres años del estudio y en las tres parcelas muestreadas: **A)** Bétera, **B)** Olocau y **C)** Náquera.

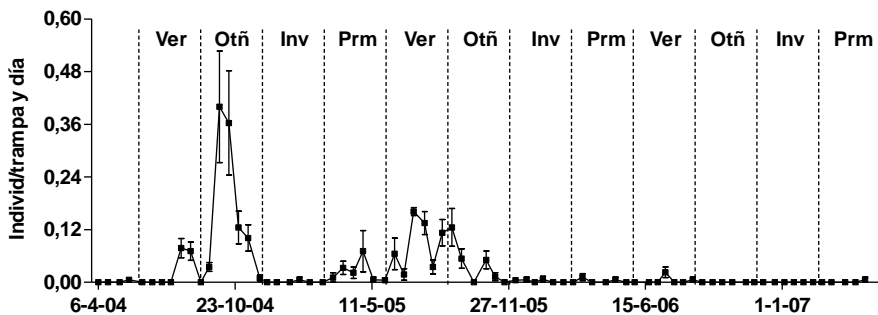




**Figura 2.21** Número medio de especímenes *E. moesta* (individuos/trampa y día  $\pm$  ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en la parcela de Olocau (cubierta monoespecífica de *F. arundinacea*). Las estaciones climáticas han sido diferenciadas y marcadas (Otñ: Otoño, Inv: Invierno, Prm: Primavera, Ver: Verano).



**Figura 2.22** Número medio de especímenes *F. auricularia* (individuos/trampa y día  $\pm$  ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en la parcela de Bétera (cubierta espontánea).



**Figura 2.23** Número medio de especímenes *E. annulipes* (individuos/trampa y día  $\pm$  ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en la parcela de Olocau (cubierta monoespecífica de *F. arundinacea*).

## 2.3.6 Cicindélidos

### 2.3.6.1 Composición de especies y abundancia relativa

Durante los tres años de muestreo se capturaron 407 especímenes adultos de la familia Cicindelidae y se diferenciaron dos especies distintas. *Cicindela* (*Cicindela*) *campestris* L. (**Fig. 2.31**) fue la especie más abundante. Esta especie apareció en las tres parcelas. La mayor parte de las capturas de *Cicindela* (*Cicindela*) *lagunensis* Gautier des Cottés se dieron en Bétera (**Tabla 2.14**).

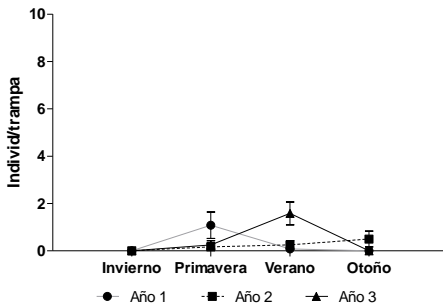
Especie	Bétera	Olocau	Náquera	Total
<i>Cicindela</i> ( <i>Cicindela</i> ) <i>campestris</i> L. 1758	25	120	46	382
<i>Cicindela</i> ( <i>Cicindela</i> ) <i>lagunensis</i> Gautier des Cottés 1872	22	0	3	25
Número total de individuos (N)	47	120	49	407

**Tabla 2.14** Número total de cicindélidos capturados con trampas de gravedad en tres parcelas de cítricos de la provincia de Valencia durante tres años de muestreos.

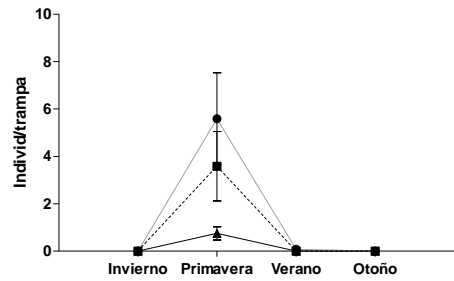
### 2.3.6.2 Patrones de actividad-densidad

Los cicindélidos mostraron una estacionalidad muy marcada, con picos poblacionales en primavera y verano (**Fig. 2.24**). *Cicindela campestris* restringe su actividad a la primavera (**Fig. 2.25**), con algún pico ocasional secundario en el otoño. *Cicindela lagunensis* tan sólo fue capturada en los meses de verano (**Fig. 2.26**).

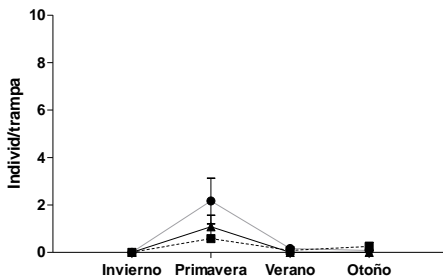
A)



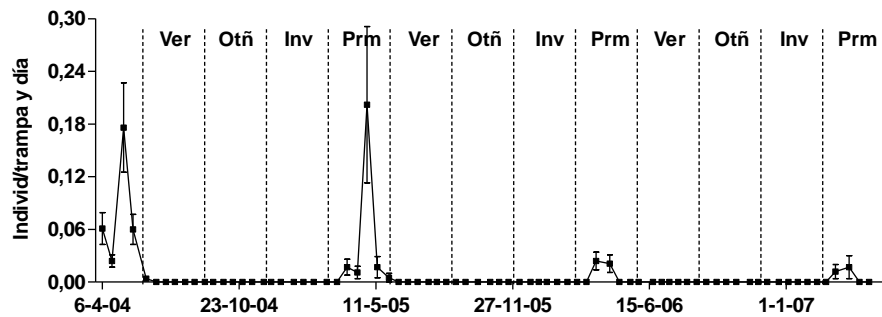
B)



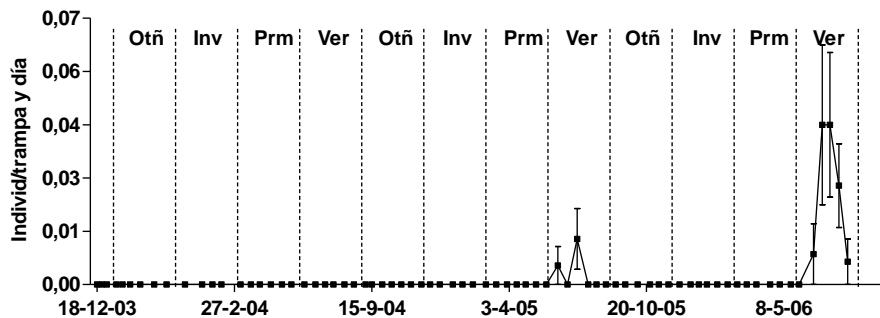
C)



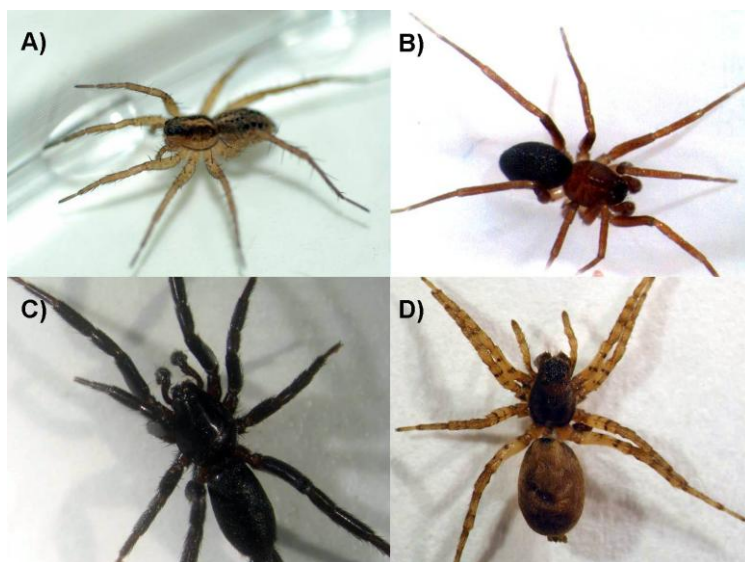
**Figura 2.24** Promedio de adultos de cicindélidos capturados por trampa, para cada estación, en cada uno de los tres años del estudio y en las tres parcelas muestreadas: **A)** Bétera, **B)** Olocau, **C)** Náquera.



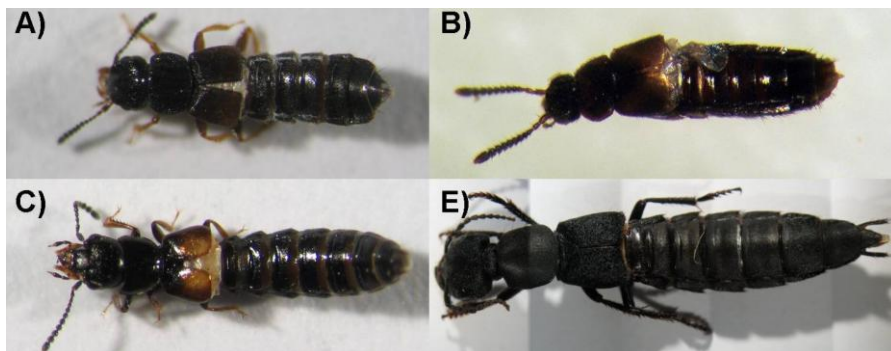
**Figura 2.25** Número medio de especímenes *C. campestris* (individuos/trampa y día  $\pm$  ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en la parcela de Olocau (cubierta monoespecífica de *F. arundinacea*). Las estaciones climáticas han sido diferenciadas y marcadas (Otñ: Otoño, Inv: Invierno, Prm: Primavera, Ver: Verano).



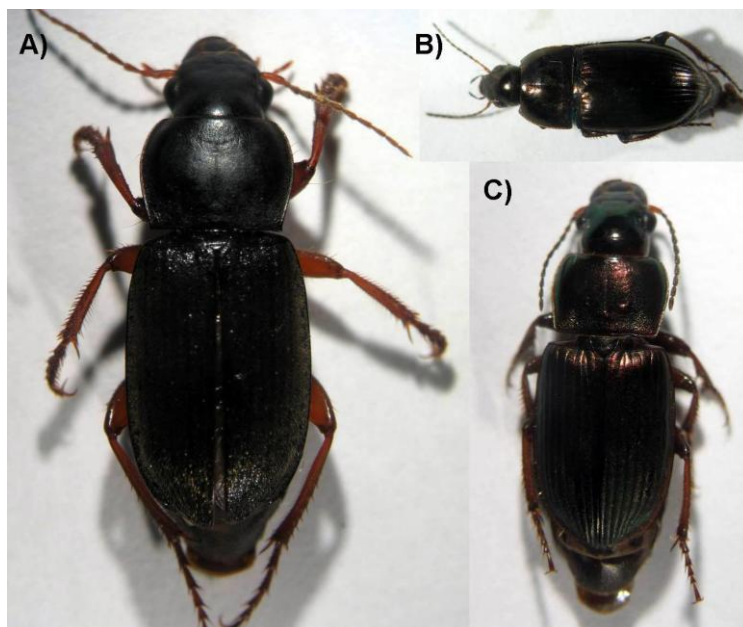
**Figura 2.26** Número medio de especímenes *C. lagunensis* (individuos/trampa y día  $\pm$  ES) recogidos en trampas de gravedad durante un periodo de tres años en la parcela Bétera (cubierta espontánea).



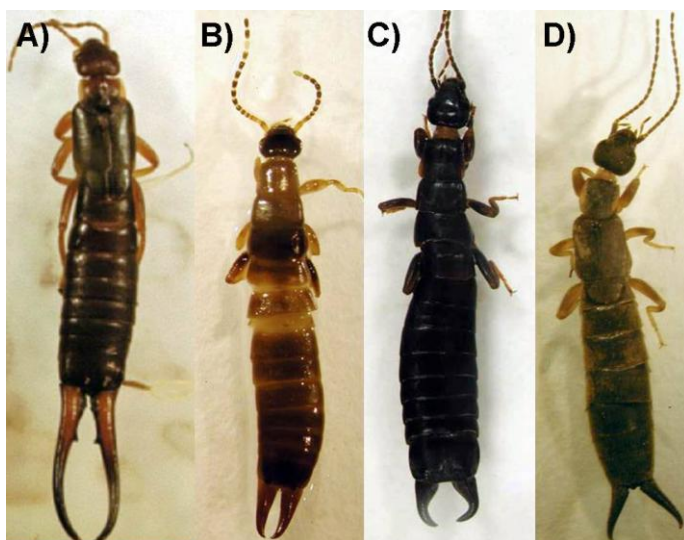
**Figura 2.27** Especies de arañas con mayor frecuencia de capturas en suelos de cítricos mediante trampas de gravedad. **A)** *Pardosa cribata* Simon, **B)** *Zodarion* sp., **C)** *Trachyzelotes fuscipes* (L. Koch) y **D)** *Arctosa perita* (Latreille).



**Figura 2.28** Especies de estafilínidos de elevada frecuencia de capturas durante este estudio en suelos de cítricos mediante trampas de gravedad. **A)** *Anotylus inustus* (Gravenhorst), **B)** *Atheta (Xenota) mucronata* Kraatz, **C)** *Platystethus cornutus* Gravenhorst y **D)** *Ocypus olens* (Müller).

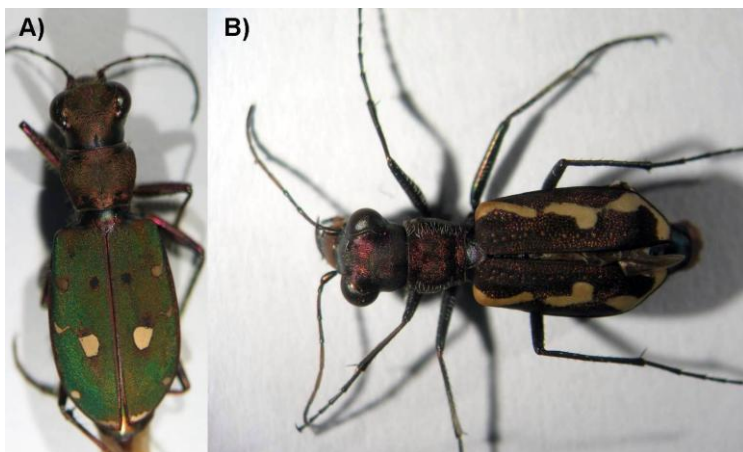


**Figura 2.29** Especies de carábidos con mayor frecuencia de capturas en suelos de cítricos mediante trampas de gravedad. **A)** *Pseudoophonus (Pseudoophonus) rufipes* (De Geer), **B)** *Amara aenea* De Geer **C)** *Harpalus (Harpalus) distinguendus* (Duftschmid).



**Figura 2.30** Especies de dermápteros presentes en suelos de cítricos.

**A)** *Forficula auricularia* L., **B)** *Euborelia annulipes* (Dohrn), **C)** *Euborellia moesta* (Gené) y **D)** *Labidura riparia* (Pallas).



**Figura 2.31** Especies de cicindélidos presentes en suelos de cítricos. **A)**

*Cicindela (Cicindela) campestris* L. y **B)** *Cicindela (Cicindela) lagunensis* Gautier des Cottes.

## 2.4 Discusión

En este capítulo se ha demostrado la existencia de un abundante y rico complejo de depredadores polífagos que tiene por hábitat los suelos de los cítricos. Algunas de las especies o géneros encontrados ya han sido citadas como agentes de control biológico en numerosos ecosistemas agrícolas (Sorokin 1981, Loughridge y Luff 1983, Holopainen y Helenius 1992, Riechert y Lawrence 1997, Lang et al. 1999, Nicholas et al. 2005), en cambio, también se han hallado diferentes especies de nueva cita para la ciencia o en la región donde se ha desarrollado el trabajo. Como ejemplo más notable tenemos a la araña del género *Zodarion* (*Zodarion* sp.) descrita por primera vez en este trabajo y que además, fue la araña más capturada en una de las parcelas. Las especies del género *Zodarion* son especialistas en la depredación de hormigas (Pekár 2005). Según estudios realizados, esta nueva especie aparece en la parcela de Bétera asociada, como depredador, a la hormiga argentina *Linepithema humile*, especie exótica de carácter invasor. Dentro de la familia Staphylinidae, la especie más capturada *A. mucronata*, es de nueva cita en la Península Ibérica y *Holotrochus hispanicus* n.sp, ha sido descrita aquí por primera vez. En numerosas ocasiones, comunidades de depredadores más diversas permiten un control biológico más eficiente de una determinada plaga (Mansour y Whitecomb 1986, Nyffeller y Benz 1997). Además de este beneficio directo, una mayor diversidad también supone una mayor plasticidad y capacidad de respuesta frente a la aparición de cualquier plaga (Duelli et al. 1999), permitiendo de esta manera, recuperar más rápidamente el equilibrio original del sistema (Pimm 1991). La predominancia de *Zodarion* sp. en el grupo de arañas de Bétera parece reflejar esta capacidad de respuesta ante un desequilibrio como el que supuso la entrada en esa parcela de la hormiga argentina.

El complejo de depredadores polífagos estudiado se mostró activo a lo largo de todo el año gracias a la combinación de los diferentes patrones de actividad estacional de las distintas especies que lo conforman. La permanente presencia de depredadores polífagos en los suelos de este cultivo puede posibilitar una rápida respuesta a la aparición de un organismo plaga y puede ayudar a frenar el crecimiento de sus poblaciones hasta la posterior acción de otros agentes de control. Como muestra de esta combinación de actividades estacionales tenemos a *P. cribata*, la araña más abundante de este estudio, *P. rufipes*, el carábido más capturado, y *F. auricularia*, el

dermáptero más importante en el conjunto de las tres parcelas muestreadas. *Forficula auricularia* era la especie dominante en los meses más fríos, en la primavera *P. cribata* se convertía en la especie más activa, y en los meses de verano y otoño era *P. rufipes* quien se mostraba más activo.

El grado de estructuración de los diferentes grupos muestreados parece variar en función del grupo de depredadores analizado. Así, las arañas conforman el grupo que presenta poblaciones mejor estructuradas. Por un lado, los datos de los tres grupos de arañas se distribuyeron como una log-normal, distribución que caracteriza aquellas poblaciones bien estructuradas (Marrugan 2004). Además, destaca la presencia de licósidos, arañas que se desplazan principalmente caminando (Luczak 1979, Weyman et al. 2002), dominando sobre otras familias como los linífidos, que al dispersarse con el viento suelen ser preponderantes en ecosistemas agrícolas más simplificados (Glück y Ingrisch 1990). Esto sugiere que el agroecosistema cítricos ofrece un hábitat semipermanente capaz de albergar una comunidad de arañas estable.

Los grupos de estafilínidos estudiados presentan estructuras poblacionales más cercanas a los modelos teóricos de las series logarítmicas y geométricas, que describen comunidades pertenecientes a ecosistemas más degradados, o con un elevado componente específico itinerante (Whittaker 1965, 1972, Magurran y Henderson 2003). Muchas especies de estafilínidos presentan una elevada capacidad de desplazamiento a través del vuelo (Markgraf y Basedow 2002). De hecho, se ha demostrado que algunas especies del género *Tachyporus* realizan vuelos a más de 10 m de altura (Sunderland 1992). Al analizar la composición específica de este grupo podemos ver que las especies dominantes son de pequeño tamaño y con elevada capacidad de vuelo. Se ha demostrado que cuanto más degradado se encuentra un hábitat, sus comunidades de estafilínidos tienden a estar dominadas por especies de tamaño pequeño (< 3 mm de longitud), y pueden ser además las poblaciones de éstas especialmente abundantes (Jennings y Tallamy 2006, Nichols et al. 2007, Caballero et al. 2009). La destacada importancia de *O. olens*, en el grupo de estafilínidos de Bétera, la parcela con presencia de una cubierta vegetal espontánea, probablemente sea debida a la mayor complejidad del hábitat que conlleva este tipo de manejo y que supone un mayor rango de presas alternativas y una mayor variedad de refugios tanto para el depredador como para



sus potenciales presas (Landis et al. 2000, Sunderland y Samu 2000, Marshall et al. 2003, Clough et al. 2007).

Los carábidos no aparecieron en una riqueza específica y abundancia suficientes, en al menos dos de los tres grupos, como para poder hacer un análisis robusto de la estructura de éstos. Diferentes trabajos denuncian los inconvenientes de utilizar trampas de gravedad a la hora de realizar un estudio de poblaciones de artrópodos del suelo (Halsall y Wratten 1988, Topping y Sunderland 1992). En el caso de los carábidos, se ha demostrado que las especies de mayor tamaño se capturan con mayor facilidad que aquéllas de menor tamaño, desvirtuando de esta manera los resultados obtenidos (Spence y Niemelä 1994, Kromp 1999). Aun así, y a pesar de estos inconvenientes, el seguimiento con trampas de gravedad en estudios intensivos a medio y largo plazo en sistemas agrícolas o en amplias zonas geográficas se considera irremplazable (Samways 1990, Kromp 1999).

El número de especies de dermápteros y cicindélidos encontrados fue tan bajo que no tiene ningún sentido hablar de grupos independientes con estos depredadores. El orden Dermaptera ya es de por sí un orden poco diverso con tan solo 1.784 especies, 182 géneros y 11 familias descritas en todo el planeta (Jarvis et al. 2005).

La comunidad de arañas del suelo resultó ser el grupo de depredadores más diverso. La riqueza en especies estimada más elevada se obtuvo en Bétera y Olocau, ambos con cubiertas vegetales permanentes. De la misma manera, los números de capturas de arañas más altos también se obtuvieron en estas dos parcelas. De nuevo, como ya se ha demostrado en otros estudios con arañas epigeas (Frank y Nentwig, 1995), la presencia de una cubierta vegetal parece ser beneficiosa a la hora de conservar este grupo de depredadores. Alvis (2003) estudió la comunidad de arañas presentes en la parte aérea de los cítricos, en la misma región citrícola donde se ha realizado este trabajo. En su estudio, se determinaron un número similar de especies al aquí obtenido. Sin embargo, al comparar las composiciones específicas de ambas comunidades, se puede ver que apenas comparten un pequeño número de especies minoritarias. En la copa, Salticidae (con un 40,7% del total de capturas) y Therididae (35,7%) fueron las familias más abundantes, mientras que Lycosidae (32,0%), Gnaphosidae (22,0%) y Zodaridae (15,9%) fueron las que dominaron la comunidad de arañas del suelo. Green (1999) obtuvo unas conclusiones similares al comparar ambas comunidades en cítricos de

Australia. A pesar de estas diferencias tan marcadas entre las dos comunidades de arañas, hay trabajos que sugieren la existencia de una interacción entre ambas (Altieri y Schmidt 1986, Wyss 1995, Wyss et al. 1995), de manera que una cubierta vegetal más compleja puede suponer un incremento en las poblaciones de arañas epigeas y a su vez, en las poblaciones de arañas de la parte aérea del cultivo (Frank y Nentwig 1995). La riqueza de la comunidad de arañas del suelo registrada en el estudio de Green (1999) fue similar (41 especies) a la registrada y estimada en éste. En cambio, Benfatto y di Franco (2002) encontraron más del doble de especies (116) en un estudio equivalente realizado en el sur de Italia. En ambos estudios, la familia dominante de la comunidad fue también Lycosidae. Las notables diferencias en los valores de riqueza obtenidos entre algunos trabajos probablemente se encuentren fuertemente influenciadas por la composición paisajística del entorno donde se han realizado los muestreos. En nuestro estudio, las parcelas se encontraban en una región donde predomina el monocultivo de cítricos, por lo que existe una composición paisajística poco diversa. Paisajes más simplificados albergan comunidades de artrópodos menos diversas y en consecuencia, a un menor número de especies depredadoras (Riechert y Lawrence 1997, Sunderland y Samu 2000). Un incremento del número de hábitats fuera del cultivo, probablemente implicaría la aparición de comunidades más diversas, tanto de arañas como de los otros grupos de depredadores (Schmidt et al. 2003).

La segunda comunidad en riqueza observada y estimada fue la de los estafilínidos. Al contrario que ocurre con las arañas, las predicciones de riqueza específica más elevadas se obtuvieron en Náquera, parcela que mantenía el suelo libre de especies vegetales. Cabe destacar que el grupo de estafilínidos de esta parcela es el que registró un mayor número de especies "raras" (1 o 2 individuos capturados). Por esta razón, los estimadores mostraron menos estabilidad y la predicción de riqueza estimada fue mucho mayor que la registrada. Además, a pesar de ser el grupo en el que se estima una mayor riqueza específica, es el que menor número de capturas registró en el estudio. El menor número de capturas de estafilínidos y la elevada presencia de especies ocasionales, parecen indicar que nos encontramos ante un grupo formado principalmente por especies no establecidas de manera permanente en este cultivo, que proceden de otros hábitats y en sus desplazamientos entran por azar en nuestra zona de estudio. Es probable que el mayor número de especies capturado en esta parcela se deba a que al no existir una cubierta vegetal, los

especímenes ocasionales encuentran con más facilidad las trampas de captura. Según nuestro conocimiento, no existen otros trabajos que estudien en profundidad la comunidad de estafilínidos presentes en los suelos de cítricos. Al comparar la comunidad de estafilínidos descrita en este trabajo con la obtenida en otros estudios realizados en otros cultivos, en España y en el resto de Europa, se observa que aunque existen algunas especies comunes a todas ellas, se da una gran variabilidad en la composición específica de la comunidad y en la abundancia relativa de las especies que la componen en función de la zona agroclimática y el tipo de cultivo (Krooss y Schaefer 1998, Andersen y Eltun 2000, Farínos et al. 2008, Miñarro et al. 2009).

Tanto la riqueza específica observada como la estimada en los tres grupos de carábidos fueron bastante bajas al compararlas con la registrada en otros estudios en diferentes cultivos. Miñarro et al. (2009) encontraron 35 especies diferentes de carábidos en un trabajo realizado en manzanos en Asturias. Farínos et al. (2008) registraron 32 especies de esta familia al estudiar la influencia del maíz transgénico en la fauna auxiliar presente en los suelos de ese cultivo. Kromp y Nitzlader (1995) encontraron 86 especies de carábidos en campos de cebada bajo manejo ecológico, situados en un entorno poco antropizado. Es probable que otra vez, estas diferencias se deban más a aspectos geográficos y paisajísticos que a otros factores intrínsecos al manejo del cultivo. Desender et al. (1994) denuncia cómo en las últimas décadas unas pocas especies de carábidos se han hecho mucho más abundantes a costa de un gran número de especies infrecuentes, que han disminuido más aún en su número llegando muchas incluso a desaparecer. Este fenómeno se ha achacado principalmente a la pérdida, durante la segunda mitad del siglo XX, de gran parte de los hábitats naturales y seminaturales que rodeaban los sistemas agrícolas (Desender et al. 1994, Kromp 1999). Aunque no hubo grandes diferencias entre los valores de riqueza estimados para los tres grupos de carábidos, éstas sí que se dieron en cuanto al número de capturas. El grupo de Bétera, con cubierta espontánea, registró un número de capturas muy superior a los otros dos. Además, este fenómeno no fue causado por el aporte de una sola o unas pocas especies muy abundantes, sino que prácticamente todas las especies del grupo fueron mucho más abundantes que en las otras dos parcelas. Al igual que ocurre con las arañas y estafilínidos de mayor tamaño, probablemente como consecuencia de un hábitat más complejo y estructurado, las poblaciones de carábidos se ven favorecidas por

este tipo de manejos. La comunidad de carábidos se caracteriza por el elevado componente granívoro de muchas de las especies que la componen. Como ejemplos más representativos tenemos el caso de los géneros *Amara*, *Harpalus* y *Pseudoophonus* (Luff 1980, Jorgensen y Toft 1997). Las cubiertas espontáneas, con una rica composición florística, ofrecen semillas en abundancia prácticamente durante todo el año, sirviendo éstas de alimento alternativo a muchas especies de carábidos (Powell et al. 1985, Honek y Martinkova 2001, Honek et al. 2003). Este fenómeno podría explicar las grandes diferencias en abundancia encontradas entre parcelas. Holliday y Hagley (1984) al comparar la influencia de la cubierta vegetal en los grupos de carábidos de parcelas de manzano en Canadá, obtuvieron resultados similares a los nuestros. En ese estudio, las poblaciones más elevadas de carábidos se obtuvieron con las cubiertas naturales, las menos abundantes se encontraron en suelo desnudo, mientras que en cubiertas monoespecíficas de festuca y centeno se obtuvieron unos valores de abundancia intermedios. A diferencia de lo que ocurre con los estafilínidos, las especies mayoritarias de esta comunidad, también lo han sido en otras comunidades de carábidos descritas en diferentes sistemas agrícolas y regiones europeas. Así, *P. rufipes*, la especie más capturada en este estudio, también ha sido encontrada como especie dominante en manzano (Miñarro et al. 2009), fue la segunda especie en frecuencia de capturas en el estudio sobre maíz transgénico de Farinós et al. (2008), y fue la especie preponderante en numerosos estudios realizados sobre comunidades de carábidos en sistemas agrícolas del este y centro de Europa (Lövei y Sárospataki 1990, Hartke et al. 1998, Andersen y Eltun 2000). Langmaack et al. (2001) al describir las seis especies mayoritarias de la comunidad de carábidos en colza de invierno en el norte de Alemania, cita entre ellas a *P. rufipes*, *A. aenea*, y una especie del género *Harpalus*.

El complejo de depredadores generalistas que habita en los suelos de cítricos podría ejercer un papel importante en el manejo de *C. capitata*. Existen estudios previos en este cultivo que relacionan depredación en campo y desaparición de pupas con la acción de estos depredadores así como con las hormigas (Eskafi y Kolbe 1990, Urbaneja et al. 2006). En este trabajo se decidió excluir la familia Formicidae, ya que a pesar de haber sido demostrada en otros estudios su eficiencia como depredadores de numerosas plagas, incluyendo *C. capitata*, (Wong y Wong 1998, Stuart et al. 2003) son más los inconvenientes que presenta su manejo al ser

asistentes de diferentes especies plaga productoras de melaza (Palacios et al. 1999).

Aparte del efecto global sobre la mosca mediterránea de la fruta de todo el conjunto de depredadores, es probable que especies de este complejo puedan llegar a desempeñar un papel importante por sí solas (Symondson et al. 2002a). Allen y Hagley (1990), identificaron por métodos serológicos a los carábidos *A. aenea*, *Harpalus (Harpalus) affinis* y al dermáptero *F. auricularia* como depredadores relevantes de larvas y pupas enterradas del tefrítido *Rhagoletis pomonella* (Walsh) en huertos de manzano.

Una vez conocida la composición específica de este complejo, la abundancia relativa de las especies que lo componen y sus actividades estacionales, para poder determinar su importancia en el control de *C. capitata* es necesario llevar a cabo una evaluación más exhaustiva de su acción como conjunto y también de aquellas especies que se piense, puedan afectar de una manera más importante a las poblaciones de esta plaga.



### **3 Evaluación de la capacidad depredadora de las especies más representativas de depredadores frente a *Ceratitis capitata***







### 3.1 Introducción

Según los resultados obtenidos en el capítulo anterior, el suelo de cítricos es un medio capaz de albergar una rica y abundante fauna de depredadores polífagos que además presenta diferentes actividades estacionales. Por su condición de generalistas, las dinámicas poblacionales de éstos depredadores probablemente sean independientes de las fluctuaciones poblacionales de una determinada presa (Symondson et al. 2002a). También, es de esperar que éstos muestren diferentes preferencias en cuanto a presas y estados biológicos de éstas (Bilde y Toft 1998, Symondson et al. 2002a). En un estudio previo realizado por Urbaneja et al (2006), se relacionó la mortalidad de pupas de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) en campo con la acción de diferentes grupos de depredadores polífagos. Esta relación se hizo en base a diferentes síntomas de depredación observados en pupas enterradas en parcelas de cítricos que luego fueron corroborados en laboratorio, donde en ensayos sin elección, se comprobó que diferentes especies de depredadores polífagos encontradas en este estudio, eran capaces de utilizar el estado de desarrollo de pupa como alimento.

Como ya se ha comentado con anterioridad, aparte del estado de pupa, *C. capitata* también aparece en el suelo en forma de larva de 3º estadio y como adulto recién emergido. Ya que estos estados pueden también ser susceptibles a la acción de los depredadores polífagos, se decidió realizar una primera evaluación en laboratorio de la capacidad depredadora de aquellas especies más representativas de cada grupo estudiado, frente a estos tres estados de desarrollo de la mosca mediterránea de la fruta.

Aparte del trabajo de Urbaneja et al. (2006), apenas existe información que nos ayude a seleccionar qué depredadores, dentro de todo el complejo existente, pueden ser a priori más aptos a la hora de tenerlos en cuenta en las diferentes estrategias de control de *C. capitata*. Por ello, se decidió utilizar un criterio de selección en base a la frecuencia de capturas y actividad estacional obtenidos en el capítulo anterior. Además, también se tuvo en cuenta la abundancia de publicaciones científicas, dentro del control biológico, que hasta la fecha existen de las diferentes especies candidatas. Este último criterio nos dará una idea del carácter cosmopolita de las especies y géneros seleccionados y a su vez, de su adaptabilidad y aptitud a la hora

de poder ser utilizados en programas de control biológico. De esta manera, y según los criterios citados, se seleccionaron el licósido *Pardosa cribata* Simon, como representante de las arañas, el carábido *Pseudoophonus (Pseudoophonus) rufipes* (De Geer) y el dermáptero *Forficula auricularia* L.

El género *Pardosa* destaca por su carácter cosmopolita y por su gran adaptabilidad a diferentes medios y tipos de cultivo, siendo generalmente, especies de este género las que suelen dominar las comunidades de arañas del suelo en una gran variedad de cultivos (Luczak 1975, Orazé et al. 1989, Mansour y Heimbach 1993, Farinós et al. 2008). Dentro del grupo de las arañas, las especies pertenecientes a la familia Lycosidae, presentan unos rasgos de comportamiento depredador similar, caracterizados por su elevada actividad depredadora diurna, el amplio espectro de presas utilizado en sus dietas y por el modo de vida errante de gran parte de sus especies. Entre las 10 arañas depredadoras generalistas más capturadas en el presente estudio, cuatro especies pertenecían a esta familia, pudiendo ser por lo tanto *P. cribata*, además, una especie modelo del comportamiento depredador frente a *C. capitata* de una de las familias de arañas de mayor relevancia en los suelos de cítricos.

*Pseudoophonus rufipes* ha sido ya objeto de estudio en diferentes trabajos relacionados con el control biológico de plagas (Loughridge y Luff 1983, Holopainen y Helenius 1992, Kromp 1999) e incluso con el de manejo de la flora arvense (Hartke et al. 1998, Honek et al. 2003). A pesar de su ciclo univoltino (Jones 1979, den Boer y den Boer-Daanje 1990), y al igual que ocurre con el género *Pardosa*, esta especie destaca por su ubicuidad y capacidad de adaptarse a medios sometidos a numerosas alteraciones como es el caso de los agrarios, siendo también una de las especies de carábidos dominantes en diferentes cultivos y diferentes regiones del planeta (Coaker y Williams 1963, Jones 1976, Lövei y Sárospataki 1990).

El carácter cosmopolita de *F. auricularia* es incluso mayor que el de los dos anteriores, existiendo numerosas citas de su presencia en diferentes cultivos y en ambos hemisferios (Suckling et al. 2006, He et al. 2008, Piñol et al. 2009). Además, existe una larga tradición de trabajos en los que se utiliza o evalúa la acción de este depredador frente a diferentes plagas (Carroll et al. 1984, Mueller et al. 1988, Solomon et al. 2000).

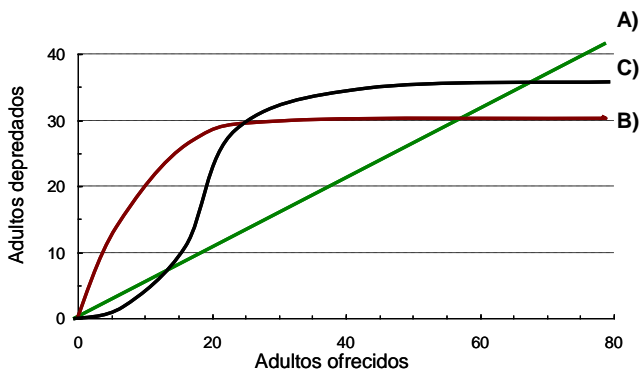
A pesar de que las tres especies de estafilínidos más capturadas, *Atheta* (*Xenota*) *mucronata*, *Anotylus inustus* (Gravenhorst) y *Platystethus* (*Craetopycrus*) *cornutus* (Gravenhorst), aparecieron en frecuencias muy elevadas, fueron excluidas de este estudio ya que en pruebas previas realizadas en laboratorio (datos sin publicar) ninguna de estas tres especies mostró actividad depredadora frente algún estado de desarrollo de *C. capitata*. Estas tres especies son de un tamaño muy reducido y es probable que utilicen presas de un menor tamaño. De hecho, como ya se ha comentado, otras especies del género *Atheta* son utilizadas, incluso de manera comercial, en diferentes programas de control biológico para el manejo de ácaros, tisanópteros o dípteros de menor tamaño (Gósrki et al. 2006, Jandricic et al. 2006). A pesar de no haber seleccionado ningún estafilínido para este estudio, existen varias especies de mayor tamaño que probablemente puedan también incorporarse al manejo de esta plaga. De hecho, Urbaneja et al. (2006) ya demostró que en ensayos sin elección de laboratorio, *Ocypus* (*Ocypus*) *olens* (O. Muller), la séptima especie de estafilínido más capturada en el presente trabajo y la tercera en la parcela con cubierta espontánea, era uno de los depredadores más voraces de pupas de mosca mediterránea de la fruta.

Tradicionalmente se han descrito dos tipos de respuesta que relacionan al depredador y su presa, con la idea de poder evaluar la eficiencia depredadora de éste frente a ese tipo de presa (Solomon 1949, Holling 1959a, Hassell 1978). Una de estas respuestas es aquella que relaciona la proporción de presas consumidas con la densidad poblacional del depredador, y que comúnmente es conocida como “respuesta numérica”. Probablemente porque son más fáciles de caracterizar, hasta la fecha, los estudios de los sistemas presa-depredador se han realizado principalmente con depredadores especialistas en los que sus poblaciones y las de la presa están altamente relacionadas (Sabelis 1992, Hassell y May 1986). Según el enfoque clásico, para que se dé un control eficaz de la especie presa, las poblaciones del depredador han de ser densidad-dependiente de las poblaciones de la presa, de manera que incrementos en las poblaciones de la presa supongan incrementos en las poblaciones del depredador que permitan un control eficiente de ésta. Este enfoque discrimina a los depredadores generalistas, en los que suele haber una desconexión entre las poblaciones del depredador y las de la presa (Riechert y Lockely 1984, Symondson et al. 2002a). Los depredadores generalistas suelen basar su dieta en un amplio espectro de fuentes de alimentación, de manera

que son capaces de mantener sus poblaciones en ciertos niveles incluso cuando un determinado tipo de presa no está presente (Settle et al. 1996, Sunderland 1999). Por otro lado, sus comúnmente largos ciclos de vida, con una o muy pocas generaciones al año (Riechert y Lockley 1984, Lövei y Sunderland 1996, Burnip et al. 2002) impide a sus poblaciones responder de una forma densidad-dependiente a corto plazo frente a rápidos incrementos de la presa. Por todas estas razones, la respuesta numérica de los depredadores generalistas ha de evaluarse con criterios diferentes a los tradicionales. Por un lado, no van a ser capaces de responder directamente a rápidos incrementos poblacionales de un determinado fitófago pero, por otro lado, debido a que sus poblaciones son más estables, pueden ejercer un control del fitófago cuando las poblaciones de éste son aún bajas y no está por lo tanto presente el especialista, e incluso pueden ayudar a este último, retrasando con su acción posibles explosiones poblacionales del fitófago hasta la posterior llegada del especialista (Zhang 1992). Las tres especies de depredadores seleccionadas, mostraron una elevada actividad estacional y también una elevada estabilidad poblacional al comparar los tres años de estudio. Por lo tanto, según los nuevos criterios aplicados para los depredadores generalistas (Riechert y Lockley 1984, Symondson et al. 2002a), las tres especies de depredadores seleccionadas, cumplirían unos requisitos adecuados desde el punto de vista de una respuesta numérica frente posibles plagas.

El otro tipo de respuesta que define la relación presa-depredador es aquel referido a la eficiencia que demuestra un depredador a la hora de rastrear y cazar una presa. Este tipo de respuesta es el que se conoce como “respuesta funcional” y relaciona el número de presas consumidas por un depredador en función de la densidad de presa (Holling 1966). La respuesta funcional puede ser descrita mediante diferentes ecuaciones que definen distintos tipos de comportamiento del depredador (Hassell 1978). Existen descritos tres tipos de respuesta funcional con larga tradición en los estudios de comportamiento de depredadores (Holling 1966, Trexler et al. 1988) (**Fig. 3.1**). Así, se ha definido una respuesta “tipo I” en la que la eficiencia depredadora responde de manera lineal a los incrementos en las densidades de presa. Este tipo de respuesta no suele ser aplicable a estudios con artrópodos (Hassell 1978). Otro tipo de respuesta, “tipo II”, relaciona la eficiencia del depredador con la densidad de presas de una forma inversa densidad-dependiente, de manera que al ir incrementando el número de presas, el depredador va perdiendo eficiencia

en cuanto a la proporción de presas depredadas, de forma hiperbólica hasta alcanzar una asíntota horizontal en la que por más presas que sean ofrecidas a éste, no va a poder incrementar el número de presas depredadas en cierta unidad de tiempo. El tercer tipo de respuesta, “tipo III” o “sigmoidea”, relaciona de manera densidad-dependiente, para cierto rango inicial de densidades de presa, la eficiencia del depredador, de tal forma que ésta se incrementa al ir incrementando las densidades. Tras superar este rango inicial de densidades de presa, como ocurre en la respuesta “tipo II”, la eficiencia del depredador pasa a ser inversa densidad-dependiente hasta alcanzar una asíntota horizontal. Este tipo de respuesta es el que a priori, va a permitir una más rápida estabilización de las poblaciones de la presa (Hassell et al. 1977, Hassell 1978). Existen descritos otros tipos de respuesta aunque de uso menos generalizado en el estudio del comportamiento depredador de artrópodos (Holling 1965, Pekár 2005).



**Figura 3.1** Representación gráfica de los tipos de respuesta funcional teóricos más frecuentes: **A)** Respuesta tipo I, **B)** Respuesta tipo II, **C)** Respuesta tipo III.

Con la respuesta funcional se definen también dos parámetros, “tiempo de manejo” ( $T_h$ ) e “índice de ataque” ( $a'$ ). El “tiempo de manejo” nos describe la habilidad de un depredador a la hora de capturar y procesar la presas, y también el tiempo que tarda el depredador luego de haber capturado y procesado una presa, en ponerse a buscar una nueva presa. Tiempos de manejo menores resultarán en una mayor eficiencia en la depredación. El índice de ataque describe la habilidad e intensidad con la que el depredador busca a su presa. Éste depende de la velocidad de movimiento tanto del depredador como de la presa, de la distancia de reacción del

depredador a su presa y de la proporción de ataques con éxito (Hassell 1978). Índices de ataque mayores resultarán en una eficiencia mayor en la depredación.

La obtención de la respuesta funcional y los parámetros de “tiempo de manejo” e “índice de ataque”, de nuestros depredadores frente a los diferentes estados de desarrollo de *C. capitata* ensayados, bajo unas mismas condiciones de ensayo, nos va a permitir evaluar su eficiencia depredadora frente a esta plaga y poder realizar comparaciones entre ellos. La respuesta funcional y sus parámetros asociados, pueden estar influidos por la acción de diferentes factores tanto bióticos (competencia inter e intraespecífica, presencia de presas alternativas [Holling 1959b, Sabelis 1992, Skalski y Gilliam 2001]), como abióticos (estructura del medio, presencia de refugios para la plaga o el depredador, temperatura y humedad relativa [Thompson 1978, Symondson 2002]) difícilmente controlables en el laboratorio. Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante este tipo de estudios no pueden ser extrapolados de manera directa a condiciones de campo, aunque nos van a permitir realizar una primera evaluación y selección de aquellas especies que valdría la pena ser estudiadas más a fondo en su medio natural, y frente a qué estados del ciclo biológico de la especie plaga.

## 3.2 Material y métodos

### *Depredadores*

Tanto para los ensayos de preferencia como para los de respuesta funcional se utilizaron especímenes adultos de *P. cribata*, *P. rufipes* y *F. auricularia* recolectados en campos de cítricos cercanos al Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Los especímenes de *P. cribata* fueron capturados de manera directa en las horas diurnas de mayor actividad de este licósido. Los carábidos se recogieron mediante la utilización de trampas de gravedad que no contenían mezcla conservante. Las trampas se revisaban cada 24 h y a primera hora de la mañana. Como la actividad de este carábido es nocturna esto nos aseguraba que los individuos capturados permanecían menos de 12 h dentro de la trampa. Los dermápteros también se recolectaron por captura directa examinando el tipo de estructuras que suelen utilizar como refugio durante el día.

Con la finalidad de estandarizar el apetito de los depredadores, cada individuo fue introducido en un bote de plástico transparente de 100 ml de volumen y con un algodón humedecido como suministro de agua. En estas condiciones de ayuno los botes se dejaron durante 7 días para las arañas y 2 para los carábidos y dermápteros en el interior de un incubador climático a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura,  $60 \pm 5\%$  de humedad y 16:8 horas (luz:oscuridad) de fotoperiodo. En todos los ensayos se guardó una proporción de sexos 1:1.

### *Presas*

Para evaluar la capacidad depredadora de estos depredadores frente a *C. capitata* se utilizó como presa larvas de tercer estadio, pupas y adultos. Los individuos de *C. capitata* utilizados en estos ensayos fueron obtenidos de la cría de laboratorio mantenida en el IVIA desde 2002. Tras recolectar huevos de menos de 24 h éstos eran sembrados a una densidad de 4 huevos g<sup>-1</sup> de dieta (Alonso et al. 2005) en bandejas de plástico con dieta artificial consistente en 400 g de salvado de hojas de trigo (Belenguer S. A, Valencia, España), 112 g de azúcar, 58 g de levadura de cerveza (Sorribas S. A, Barcelona, España), 4,5 g de metilo p-hidroxibenzoato (Sigma Co., St. Louis, MO, USA), 4,5 g de propilo p-hidroxibenzoato (Sigma Co.), 4 g de ácido benzoico (Quimivita S. A, Barcelona, España) y 900 ml de agua (Albajes y Santiago-Álvarez, 1980). Las bandejas de siembra se situaban en estantes de rejilla y se cubrían con papel de aluminio para evitar posibles contaminaciones con

*Drosophila* spp. y simular el desarrollo de las larvas en oscuridad dentro de los frutos. Bajo éstas estanterías se situaban otras bandejas con arena húmeda. Las larvas desarrolladas en la dieta, 16 días después, saltaban fuera de las bandejas para enterrarse y pupar dentro de la arena. Para realizar los ensayos de depredación se utilizaron larvas de 15 días y pupas de 1 día. Para la obtención de adultos se recogieron 1.000 pupas de menos de 24 h y se introdujeron en una caja transparente de metacrilato (20 x 20 x 20 cm) hasta su emergencia. Éstos eran luego mantenidos con una dieta a base de azúcar y proteína hidrolizada (Biokar Diagnostics Co., Pantin, France) con una proporción 4:1 (p:p) y se les suministraba agua mediante frascos lavadores con una mecha absorbente. Todo el proceso de cría se realizó en cámaras climáticas con condiciones controladas de temperatura ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ), humedad ( $60 \pm 5\%$ ) y fotoperiodo (16:8 horas, luz:oscuridad).

### 3.2.1 Ensayos de preferencia

Los ensayos de preferencia tan sólo fueron realizados con el licósido *P. cribata*. Mediante este tipo de ensayo se evaluó la capacidad depredadora de esta araña frente a los tres estados de *C. capitata* que aparecen en el suelo. Tras el periodo de ayuno, los especímenes de araña fueron transferidos de manera individual a cajas de plástico (15 x 7 x 10 cm) en las que en su tapa se realizó un agujero de (12 x 8 cm) cubierto con una muselina para favorecer la ventilación. El suministro de agua se realizó de la misma manera que durante el periodo previo de ayuno. Se realizaron tres tratamientos, cada uno utilizando uno de los estados de *C. capitata* anteriormente citados. En cada unidad de ensayo se introdujeron diariamente 5 pupas sin enterrar, 5 larvas de 3º estadío o 5 adultos de tres días dependiendo del tratamiento. En cada tratamiento se introdujo un control en el que había 5 individuos de la presa sin presencia depredador. Para los tratamientos de pupas y adultos se realizaron 12 repeticiones mientras que para el de larvas se realizaron 11 repeticiones. El número de individuos muertos y/o consumidos por el depredador fue contabilizado diariamente.

### 3.2.2 Respuesta funcional

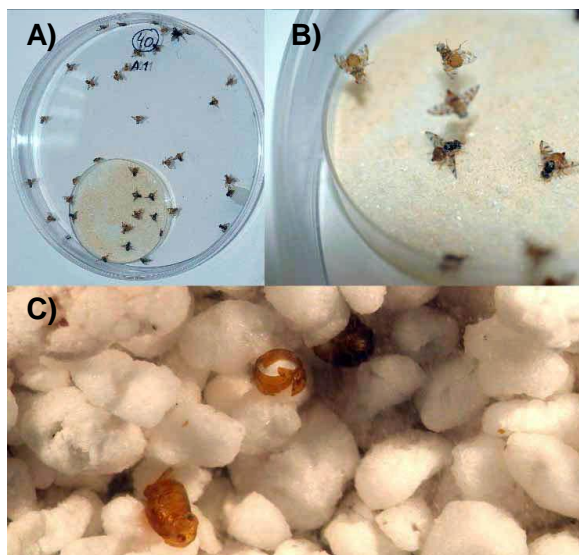
Los ensayos de respuesta funcional se realizaron con las tres especies de depredadores seleccionadas y utilizando como presa los tres estados de *C. capitata* previamente citados. En el caso de *P. cribata* se utilizó como presa únicamente



adultos, ya que fue frente a este estado de desarrollo biológico con el que mejores resultados se obtuvieron en los ensayos de preferencia. Con *P. rufipes*, se obtuvo la respuesta funcional para los tres estados, y *F. auricularia* fue ensayada frente a larvas de 3º estadio ya que pruebas previas con pupas y adultos habían demostrado una baja eficiencia depredadora. En todos los casos se enfrentaron especímenes individualizados del depredador correspondiente a diferentes densidades de presa, en una unidad de ensayo consistente en una placa Petri cerrada (14 cm de diámetro y 1,6 cm de alto) (**Fig. 3.2A**). La unidad de ensayo utilizada fue escogida con la finalidad de simular en el tratamiento con adultos, un comportamiento de adultos recién emergidos, en el que las moscas no pueden escapar volando del depredador. La decisión de simular el tratamiento de adultos recién emergidos en vez de utilizar éstos directamente, fue tomada debido a que los adultos son menos delicados a la hora de su manipulación, permite estandarizar los tiempos de ensayo en la respuesta funcional a 24 h, y además, en pruebas realizadas previamente, no se encontraron diferencias estadísticas en la depredación entre adultos recién emergidos y adultos, utilizando esta unidad de ensayo. En los ensayos con *P. rufipes* y *F. auricularia*, para facilitar el movimiento de los depredadores se añadió en el interior de la placa una capa fina de sustrato humedecido de perlita (Floreal, Agroperlita F-13®; Semillas Diago S.L. Picassent, Valencia, Esp).

La respuesta funcional de *P. cribata* frente a adultos de *C. capitata* fue obtenida utilizando como densidades de presa 2, 4, 6, 8, 12, 20 y 40 adultos. La respuesta funcional de *P. rufipes* se obtuvo utilizando como densidades de presa 2, 4, 8, 12, 20, 40 y 60 individuos. En el caso de *F. auricularia* se utilizaron densidades de 2, 4, 8, 12, 20, 60, 80 individuos. Para cada densidad se realizaron 8 repeticiones. El tiempo de ensayo fue de 24 h, tras el cual, el depredador era retirado y se contabilizaba el número de presas muertas y/o depredadas. En ningún caso hubo reposición de presas. Para cada ensayo de respuesta funcional se realizó un tratamiento control en ausencia del depredador y a una densidad de presa de 20 individuos con la finalidad de evaluar la mortalidad en presas debidas a causas naturales. En los tratamientos en los que se utilizaron adultos de *C. capitata*, para evitar la mortalidad debida a la falta de alimentación, se dispuso de dieta de azúcar y proteína hidrolizada (**Fig. 3.2B**). Para evaluar la posible mortalidad debida a un comportamiento anti-depredador de los adultos de *C. capitata* al intentar escapar del depredador y estrellarse contra las paredes de la placa, se realizó un segundo

tratamiento control en el que dentro de la unidad de ensayo, el depredador estaba confinado en una placa petri de 4 cm de diámetro. De esta manera, el depredador y la presa eran capaces de reconocerse mediante contacto visual pero se evitaba la mortalidad directa por depredación.



**Figura 3.2 A)** Unidad experimental utilizada para la evaluación de la respuesta funcional. **B)** Suministro de alimento para los adultos de *C. capitata* dentro de la unidad de ensayo. **C)** Síntomas de depredación en pupas causados por el carábido *P. rufipes*.

### 3.2.3 Análisis de datos

En el ensayo de preferencia, para analizar las diferencias en la depredación entre los diferentes estados, los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza de un factor (SPSS 1999).

En los experimentos de respuesta funcional, para poder discriminar entre respuestas tipo II y tipo III, se realizó una regresión logística de la proporción relativa de presas muertas en cada densidad (Trexler et al. 1988, Juliano 2001). Los datos se ajustaron a una función polinómica de segundo orden a través del método de máxima verosimilitud (SPSS 1999). Tras este ajuste, la obtención de un coeficiente lineal positivo y uno cuadrático negativo supone que los datos ajustan mejor a una respuesta tipo III, mientras que la obtención de un coeficiente lineal negativo implica un mejor ajuste a una respuesta tipo II. Una vez realizado este análisis preeliminar, los datos fueron ajustados a su correspondiente ecuación de respuesta funcional.

Debido a que en estos ensayos se utilizaron depredadores y además no hubo reposición de presas, el ajuste se realizó utilizando la ecuación “random-predator” (Royama 1971, Rogers 1972) para respuestas tipo II. Para una mayor precisión en el ajuste, se excluyeron en cada caso, los datos de densidades en los que todas las presas habían sido depredadas. En los tratamientos en los que se utilizaron larvas de 3º estadio, a la hora de realizar el análisis, se descontaron los valores de larvas que puparon durante el tiempo de ensayo. El ajuste de datos para la obtención de las ecuaciones de respuesta funcional se realizó mediante regresión no lineal de mínimos cuadrados utilizando el método iterativo de estimación de Levenber-Maarquardt (SPSS 1999). A partir de los ajustes a estas ecuaciones se estimaron los parámetros de respuesta funcional, índice de ataque ( $a'$ ) y tiempo de manejo ( $T_h$ ).

En los tratamientos de respuesta funcional en los que se utilizaron adultos, para conocer si había un efecto significativo por el comportamiento anti-depredador, los datos de los dos tipos de control fueron sometidos a un t-test de comparación de medias.

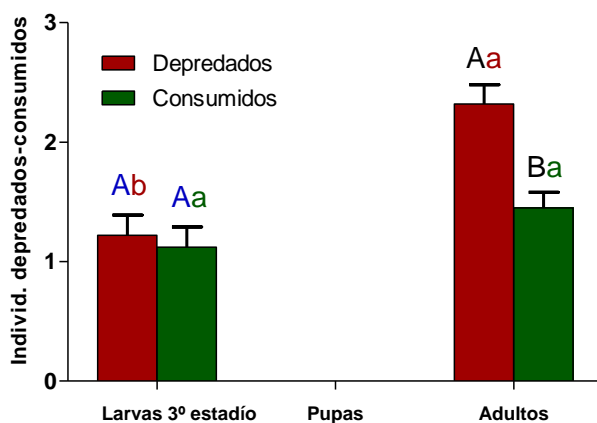
En el ensayo de respuesta funcional de *P. cribata* frente a adultos de *C. capitata*, para conocer si existían diferencias entre el número de presas muertas y el número de presas consumidas al ir incrementando la densidad de presas, se realizó un análisis con Modelos Lineales Generalizados de la proporción de presas consumidas (consumido/muerto), asumiendo una distribución binomial de la variable, y se obtuvieron los contrastes entre densidades.

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 *Pardosa cribata*

##### 3.3.1.1 Ensayos de preferencia

*Pardosa cribata* fue capaz de depredar larvas y adultos de *C. capitata* pero no pupas. El número promedio de adultos muertos por *P. cribata* ( $2,32 \pm 0,16$ ) fue significativamente superior al número de larvas de tercer estadio muertas ( $1,22 \pm 0,17$ ) ( $F = 20,598$ ;  $gl = 1, 22$ ;  $P < 0,001$ ). Sin embargo, no hubo diferencias estadísticas entre el número medio de adultos y larvas de tercer estadio consumidos ( $1,45 \pm 0,13$  y  $1,12 \pm 0,17$  respectivamente) ( $F = 1,584$ ;  $gl = 1, 22$ ;  $P = 0,222$ ). El número de adultos muertos ( $2,32 \pm 0,16$ ) fue significativamente superior al número de adultos consumidos ( $1,45 \pm 0,13$ ) ( $F = 15,843$ ;  $gl = 1, 23$ ;  $P < 0,001$ ). Por tanto *P. cribata* mató más presas de las que luego consumió. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas entre el número medio de larvas muertas ( $1,22 \pm 0,17$ ) y el número medio de larvas consumidas ( $1,12 \pm 0,17$ ) ( $F = 0,041$ ;  $gl = 1, 23$ ;  $P = 0,842$ ) (**Fig. 3.3**).



**Figura 3.3** Depredación media ( $X \pm ES$ ) por día de larvas, pupas y adultos de *C. capitata* por *P. cribata* en un ensayo sin elección. A cada araña se le ofrecieron 5 presas. Dentro de cada tratamiento, letras mayúsculas diferentes implican diferencias significativas entre presas depredadas y consumidas. Entre tratamientos, letras minúsculas diferentes implican diferencias significativas entre presas depredadas o entre presas consumidas (LSD,  $P < 0.05$ )

### 3.3.1.2 Respuesta funcional

La mortalidad en los dos controles diseñados, en ausencia del depredador y en presencia de éste pero confinado, fue del 1,3 y 1,9%, respectivamente. No hubo diferencias significativas entre ambos controles ( $t = 0,509$ ;  $gl = 14$ ;  $P = 0,6186$ ). *Pardosa cribata* mató más moscas de las que luego consumió (**Tabla 3.1**). Se encontraron diferencias significativas entre el número de adultos muertos y consumidos al ir incrementándose la densidad de presa ( $F = 10,95$ ;  $gl = 6, 49$ ;  $P < 0,0001$ ). Éstas diferencias aparecieron a la densidad de 20 ( $t = 2,50$ ;  $gl = 49$ ;  $P = 0,0015$  en el contraste 12 vs. 20) y aumentaron significativamente a la densidad de 40 ( $t = 2,50$ ;  $gl = 49$ ;  $P = 0,0156$  en el contraste 20 vs. 40). El valor estimado de los coeficientes lineal y cuadrático de la regresión logística de la proporción de presas muertas fue  $-0,165 \pm 0,036$  y  $0,0025 \pm 0,0007$ , respectivamente. Ambos parámetros resultaron significativos ( $gl = 45$ . lineal:  $\chi^2 = 22,38$ ;  $P < 0,05$ . cuadrático:  $\chi^2 = 13,35$ ;  $P < 0,05$ ). La respuesta funcional obtenida fue tipo II (**Figura 3.4**) ya que el coeficiente lineal estimado fue negativo y el cuadrático positivo. El índice de ataque estimado fue de  $0,771 \pm 0,213 \text{ días}^{-1}$  y el tiempo de manejo de  $0,051 \pm 0,013 \text{ días}$  (**Tabla 3.2**).

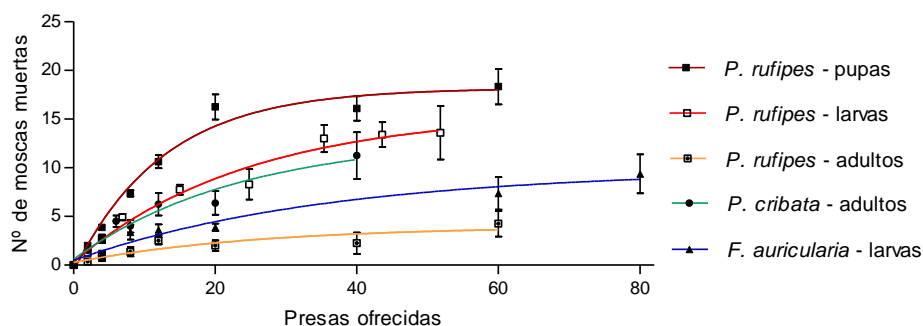
Densidad de presa	Adultos muertos	Adultos consumidos
2	1,50 $\pm$ 0,19	1,25 $\pm$ 0,16
4	2,75 $\pm$ 0,37	2,25 $\pm$ 0,37
6	4,50 $\pm$ 0,60	4,13 $\pm$ 0,64
8	4,00 $\pm$ 0,65	3,13 $\pm$ 0,44
2	6,25 $\pm$ 1,16	5,13 $\pm$ 1,20
20	6,38 $\pm$ 1,21	3,13 $\pm$ 0,67
40	11,25 $\pm$ 2,41	3,13 $\pm$ 0,79

**Tabla 3.1** Adultos de *Ceratitis capitata* muertos y consumidos ( $X \pm ES$ ) por *P. cribata* a diferentes densidades de presa.

### 3.3.2 *Pseudophonus rufipes*

#### 3.3.2.1 Respuesta funcional

Los coeficientes lineal y cuadrático estimados en la regresión logística de la proporción de presas muertas fueron  $-0,169 \pm 0,021$  y  $0,0015 \pm 0,0003$ , respectivamente para el ensayo con pupas. Ambos parámetros resultaron significativos ( $gl = 57$ . lineal:  $\chi^2 = 83,60$ ;  $P < 0,01$ . cuadrático:  $\chi^2 = 35,92$ ;  $P < 0,01$ ). En el ensayo con larvas, los valores estimados de los coeficientes lineal y cuadrático fueron  $-0,081 \pm 0,015$  y  $0,0008 \pm 0,0002$ , respectivamente, siendo también aquí los dos parámetros significativos ( $gl = 55$ . lineal:  $\chi^2 = 28,99$ ;  $P < 0,01$ . cuadrático:  $\chi^2 = 14,95$ ;  $P < 0,01$ ). En el ensayo frente a adultos, los valores estimados de estos coeficientes fueron  $-0,082 \pm 0,024$  y  $0,0009 \pm 0,0003$  con ambos parámetros significativos ( $gl = 55$ . lineal:  $\chi^2 = 12,24$ ;  $P < 0,01$ . cuadrático:  $\chi^2 = 6,74$ ;  $P < 0,01$ ). La respuesta funcional obtenida en todos los casos fue tipo II (**Figura 3.4**) ya que todos los coeficientes lineales estimados fueron negativos y los cuadráticos positivos. Los índices de ataque obtenidos fueron de  $3,070 \pm 1,134 \text{ días}^{-1}$  para la respuesta frente a pupas,  $0,855 \pm 0,213 \text{ días}^{-1}$  para el ensayo con las larvas y  $0,055 \pm 0,101 \text{ días}^{-1}$  para el de adultos. Los tiempos de manejo estimados fueron de  $0,048 \pm 0,003 \text{ días}$  para el ensayo con pupas,  $0,044 \pm 0,008 \text{ días}$  para el de larvas y  $0,095 \pm 0,043 \text{ días}$  (para el de adultos (**Tabla 3.2**). En la respuesta funcional con adultos, como los intervalos de confianza estimados de los dos parámetros incluyen el 0, la estimación de éstos no fue considerada como significativa.



**Figura 3.4** Número de presas muertas ( $X \pm ES$ ) a las diferentes densidades de presa para *P. cribata* frente a adultos de *C. capitata*, *P. rufipes* frente a pupas, larvas y adultos, y *F. auricularia* frente a larvas, y sus correspondientes curvas de respuesta funcional (tipo II) por ajuste no lineal de mínimos cuadrados.

### 3.3.3 *Forficula auricularia*

#### 3.3.3.1 Respuesta funcional

Los coeficientes lineal y cuadrático estimados de la regresión logística de la proporción de presas muertas fueron  $-0,049 \pm 0,014$  y  $0,0004 \pm 0,0002$ , respectivamente. Ambos parámetros resultaron significativos ( $gl = 46$ . lineal:  $\chi^2 = 12,27$ ;  $P < 0,01$ . cuadrático:  $\chi^2 = 5,14$ ;  $P < 0,05$ ). La respuesta funcional obtenida fue tipo II (**Figura 3.4**) ya que el valor estimado del coeficiente lineal fue negativo y del cuadrático positivo. El índice de ataque obtenido fue de  $0,296 \pm 0,075$  días<sup>-1</sup> y el tiempo de manejo de  $0,065 \pm 0,014$  días (**Tabla 3.2**).

	Índice de ataque (d <sup>-1</sup> )		Tiempo de manejo (d)	
	Estimación	Error típico	Estimación	Error típico
<i>P. criбата</i> sobre adultos	0,771	0,213	0,051	0,013
<i>P. rufipes</i> sobre pupas	3,07	1,134	0,048	0,003
<i>P. rufipes</i> sobre larvas	0,855	0,213	0,044	0,008
<i>P. rufipes</i> sobre adultos	0,055	0,101	0,095	0,043
<i>F. auricularia</i> sobre larvas	0,296	0,075	0,065	0,014

**Tabla 3.2** Índices de ataque y tiempos de manejo estimados para *P. criбата*, *P. rufipes* y *F. auricularia*, ensayados frente a los diferentes estados de *Ceratitis capitata* que pueden aparecer en el suelo, tras el ajuste a sus correspondientes curvas de respuesta funcional.

### 3.4 Discusión

Las tres especies de depredadores estudiadas utilizaron como presa a *C. capitata* en los ensayos de sin elección realizados en laboratorio. Además, cada una de ellas mostró una eficiencia depredadora diferente dependiendo del estado de desarrollo ofrecido como presa, de manera que las tres especies se complementarían en su acción como agentes de control de esta plaga. De hecho, *P. cribata* se mostró más eficaz frente adultos, *P. rufipes* frente a pupas y larvas de 3º estadio, y *F. auricularia* frente a la larvas de 3º estadio.

Para todos los ensayos de respuesta funcional realizados se obtuvieron respuestas tipo II. Por las características previamente descritas, las respuestas tipo III son las consideradas tradicionalmente como más eficientes en el manejo de plagas. A pesar de ello, son más los casos en la literatura en los que artrópodos depredadores con potencial uso en control biológico muestran una respuesta tipo II, siendo además capaces de realizar un control efectivo de su presa. De hecho, tradicionalmente a la respuesta tipo II se le ha denominado “la curva de los invertebrados” (Hassell 1978, Samu y Biró 1993).

Si comparamos los tiempos de manejo e índices de ataque estimados para los diferentes depredadores y tipos de presa, podemos observar que *P. rufipes* fue la especie depredadora que mostró una mayor eficiencia a la hora de depredar a *C. capitata*. De hecho, con esta especie se obtuvieron los tiempos de manejos menores y los índices de ataque mayores para el caso de pupas y larvas de 3º estadio. *Forficula auricularia* fue de las tres especies ensayadas, la que mostró una menor eficiencia en la depredación.

Según nuestro conocimiento, no existen otros trabajos en los que se calcule los parámetros de respuesta funcional de estos depredadores frente a moscas de la fruta. Samu y Biró (1993) calcularon la respuesta funcional del licósido *Pardosa hortensis* Thorell cuando utilizaba como presa la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae). En este trabajo no se calculó el índice de ataque pero el tiempo de manejo obtenido fue ligeramente inferior a los calculados para nuestras especies ensayadas. Esto probablemente se deba al menor tamaño de *D. melanogaster* que supondría un manejo y consumo de la presa más rápido.



*Pardosa cribata* se mostró activa depredando tanto el estado de adultos como el de larvas de 3º estadio y en cambio no presentó actividad frente a pupas. En el trabajo realizado por Urbaneja et al. (2006), *P. cribata* llegó a utilizar pupas de *C. capitata* como presa. La diferencia en los resultados obtenidos respecto a nuestro trabajo probablemente sea debida a diferencias en la metodología utilizada. Aun así, los valores de depredación obtenidos frente a pupas por Urbaneja et al. (2006) son muy bajos. El comportamiento depredador descrito para *P. cribata* puede deberse principalmente a que el ataque de las arañas es estimulado por el movimiento; contra más móvil sea la presa más se va a ver incitado este depredador a atacar. Esta cualidad de las arañas también se ve reflejada al comparar los resultados de depredación entre larvas de 3º estadio y adultos. *Pardosa cribata* mató más adultos (de mayor actividad) que larvas de 3º estadio. En cambio, no se encontraron diferencias significativas entre el número de larvas y el número de adultos consumidos. *Pardosa cribata* mató muchos más adultos de los que luego se alimentó. Este fenómeno conocido como “overkilling” o “sobreexplotación”, es considerado una característica positiva en el control biológico, y ya ha sido descrito en otras especies de araña (Riechert y Lockley 1984, Mansour y Heimbach 1993, Pekár 2005).

*Pseudoophonus rufipes* fue el depredador más voraz de los tres ensayados. Los carábidos destacan por su gran voracidad pudiendo llegar a consumir en un día una masa similar a la de su cuerpo (Thiele 1977, Kromp 1999). La tribu Harpalini, es considerada omnívora con un alto componente granívoro (Jorgensen y Toft 1997, Holland y Luff 2000, Honek et al. 2003). Además, *P. rufipes*, parece mostrar una mayor preferencia por aquellas semillas de un mayor tamaño y con testas más blandas (Honek et al. 2003). Aunque históricamente los carábidos han sido considerados como depredadores generalistas (Thiele 1977, Allen 1979, Luff 1987), en numerosas ocasiones la aportación de proteína animal a su dieta la realizan aprovechando el material de presas poco activas, ya sean estados de desarrollo que presentan baja movilidad, presas dañadas o incluso cadáveres, pudiendo ser considerados casi más como saprófagos carroñeros que como depredadores (Lindroth 1992). Es probable que sea por estas razones por las que *P. rufipes* mostró una elevada actividad en la depredación de pupas (que además podrían asemejar en su morfología y tamaño a semillas), larvas de 3º estadio, que presentan una movilidad restringida, y en cambio, apenas mostró depredación frente a adultos, que

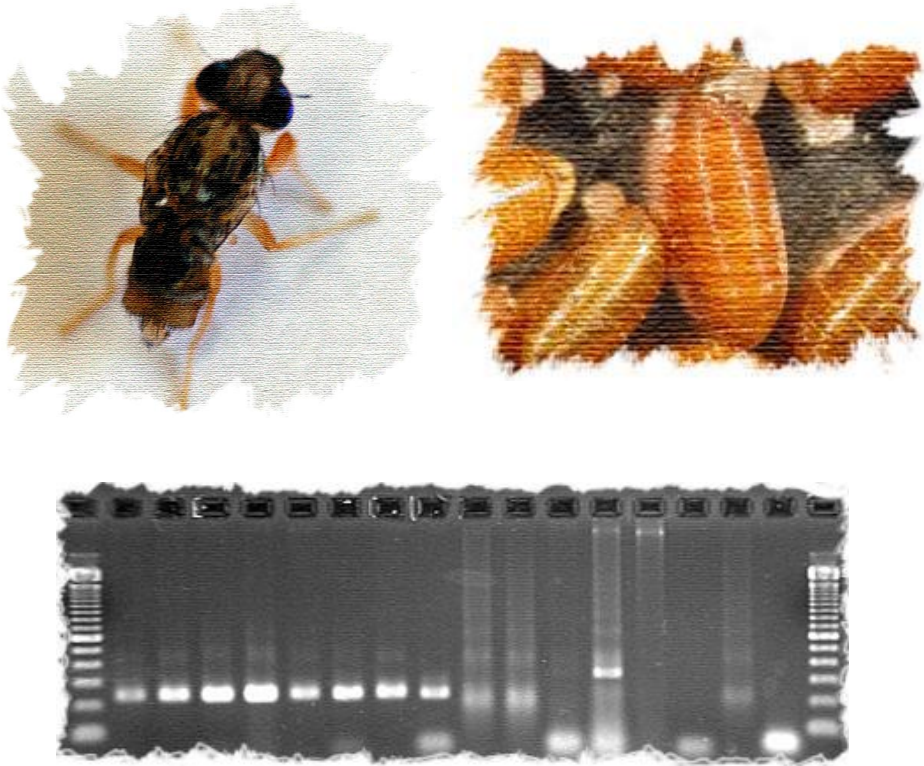
son el estado más activo. Los carábidos presentan una elevada capacidad de rastrear las presas (Lövei y Sunderland 1996). Así, existen estudios que demuestran que *P. rufipes* puede rastrear colonias de pulgones al identificar el principal constituyente de la feromona de alarma de áfidos (E)- $\beta$ -farneseno (EBF) (Kielty et al. 1996). En laboratorio, Finch y Elliot (1994) demostraron que el carábido *Pterostichus melanarius* (Illiger) reducía poblaciones de larvas de tóxicas (*Tipula* spp.) probablemente buscando esta presa bajo el suelo gracias a la utilización de estímulos olfativos. Monteith (1975) encontró que las especies de carábidos *Calosoma calidum* (Fabricius) y *Harpalus pennsylvanicus* De Geer detectaban, desenterraban y consumían pupas de *Rhagoletis pomonella* (Walsh) (Diptera: Tephritidae) bajo condiciones de laboratorio. Además, muchas especies son capaces de recuperar semillas de plantas que están enterradas en los 3 primeros centímetros de la superficie del suelo (Schremmer 1960, Manley 1971, Hartke et al. 1998), medio en el que en la mayoría de casos se va a desarrollar el estado de pupa de la mosca mediterránea de la fruta. Según nuestro conocimiento, no existen estudios que evalúen la capacidad de rastrear pupas de dípteros por parte de esta especie de carábido, aunque Urbaneja et al. (2006) identificó síntomas de depredación atribuidos a carábidos o estafilínidos en pupas de *C. capitata* enterradas a una profundidad de aproximadamente 5 cm en parcelas de cítricos.

*Forficula auricularia* utilizó como presa en laboratorio larvas de 3º estadio, aunque según los parámetros obtenidos de respuesta funcional, no presentó tanta eficiencia como *P. cribata* y *P. rufipes*. Existen numerosos estudios que evalúan y demuestran la eficacia de este depredador polífago en el control de diferentes especies de pulgones en frutales de pepita (Carroll et al. 1985, Mueller et al. 1988, Nicholas et al. 2005). Además de éstos, se conoce que esta especie se alimenta también de dípteros, coleópteros, lepidópteros, himenópteros, colémbolos y otros hemípteros (Phillips 1981, Lenfant et al 1994). Piñol et al. (2009) relacionó el control de pulgones con la actividad depredadora de esta especie, en cítricos del mediterráneo español. Por otro lado, no hay estudios que nos hablen de la capacidad de depredación de esta especie frente a dípteros en cítricos. Debido al elevado componente fitófago en sus hábitos alimenticios, poblaciones elevadas de este dermáptero pueden suponer un problema añadido sobre todo en plantaciones jóvenes y en épocas de brotación, ya que a veces utilizan los brotes tiernos como fuente de alimentación mermando de esta manera el vigor de la planta (Beitia 1998).

Como los ensayos realizados para evaluar la capacidad depredadora de estas tres especies de artrópodos son ensayos de laboratorio, en condiciones artificiales que simplifican aquellas que se dan en campo, la forma de las curvas de respuesta funcional estimadas probablemente sean diferentes a las que se obtendrían en su medio natural, en las que numerosos factores, tanto bióticos como abióticos afectan a las relaciones presa-depredador (Symondson et al. 2002a). La existencia de una gran variedad de presas alternativas, la elevada complejidad estructural del medio en el que se dan estas relaciones y unas condiciones ambientales mucho más variables que las simuladas en laboratorio son algunos de estos factores que van a determinar el verdadero valor de estos depredadores a la hora de ser utilizados en programas de control biológico. Por esta razón, es necesario completar el presente estudio con una evaluación de la capacidad depredadora de las especies seleccionadas, en condiciones reales de campo.



## 4 Detección de depredación de *Ceratitis capitata* por marcadores moleculares





## 4.1 Introducción

Conocida la composición del complejo de depredadores polífagos que habita en los suelos de cítricos, sus patrones de actividad estacional y el comportamiento depredador en laboratorio de las especies más representativas, el siguiente objetivo planteado fue realizar una primera evaluación del impacto real de estas especies sobre la mosca mediterránea de la fruta. Los resultados obtenidos en el capítulo anterior nos orientarán en el diseño de un ensayo de campo y nos ayudarán a interpretar con mayor precisión los resultados obtenidos en éste.

Existen diferentes aproximaciones a la hora de poder obtener un registro de cómo se está comportando un sistema depredador-presa en su medio natural. De ellas, la más evidente es la observación directa, ya sea por observadores en campo o utilizando sistemas de vídeo (Merfield et al. 2004, Frank et al. 2007). La observación directa presenta la ventaja de proporcionar una información muy valiosa acerca de los procesos que determinan el encuentro entre el depredador y su presa. Por otro lado, tiene los inconvenientes de requerir de mucho tiempo y mano de obra (Sunderland 1988, Völkl 1992); para poder llevarse a cabo de manera efectiva ha de ser fácilmente identificable tanto el depredador como su presa; y además, la sola presencia del observador muchas veces supone la alteración de las condiciones en las que se da este encuentro (Symondson 2002).

Otro enfoque utilizado en la realización de este tipo de estudios es la manipulación de un entorno natural más o menos controlado, a través de ensayos de exclusión (Mansour et al. 1980, Itô et al. 1962), o mediante la recreación de un entorno artificial que simule las condiciones de campo (Riechert y Lawrence 1997). El problema de este tipo de ensayos es que son muy costosos y además, cuando se trabaja con depredadores generalistas, donde el rango de presas que utilizan es tan amplio, resulta prácticamente imposible reproducir con suficiente fidelidad el escenario real (Sunderland 1988).

Una tercera aproximación al problema de la evaluación de la depredación en campo es la que tradicionalmente se ha conocido como metodologías post-mortem (Sunderland 1988, Symonson 2002, Harper et al. 2005). Esta clase de ensayos evalúa la depredación una vez ya ha sucedido. Para ello, aquellos depredadores objeto de estudio son capturados y llevados al laboratorio donde se analiza el

contenido de su tracto digestivo, y de esta manera, se puede conocer qué tipos de presa han estado utilizando. La principal ventaja de esta clase de ensayos es que el observador no influye en el proceso de depredación (Sunderland 1988, Symondson 2002). Además, con este tipo de métodos es posible evaluar la depredación de sistemas depredador-presa que de otra manera sería muy difícil por el carácter críptico del encuentro (Thomas et al. 2009). Como ejemplo claro tendríamos el estudio de los carábidos, familia en la que muchas de sus especies son nocturnas, de hábitos solitarios y que en numerosas ocasiones buscan sus presas bajo tierra y por lo tanto ocultas al observador. Los principales inconvenientes que presentan estas técnicas son que en muchos casos la identificación de la presa no es algo directo; es difícil darle un valor cuantitativo a los datos obtenidos; y como además no existe una observación del proceso, muchas veces es imposible discernir si el resultado obtenido se debe a depredación directa, depredación secundaria o comportamientos carroñeros (Foltan et al. 2005, Juen y Traugott 2005).

El método de análisis post-mortem de más larga tradición es la visualización directa o bajo lupa binocular del contenido del tracto digestivo del depredador, y la subsecuente identificación taxonómica de los posibles restos de presa aún no digeridos (Forbes 1883, Aussel y Linley 1994, Triltsch 1997). Este tipo de análisis requiere de poco soporte técnico, pero presenta el gran inconveniente de que muchos depredadores se alimentan parcial o totalmente de partes no sólidas de sus presas, haciendo imposible su identificación y por lo tanto, proporcionando una información sesgada (Dennison y Hodgkinson 1983). Otras metodologías utilizadas para los análisis post-mortem incluyen el estudio comparativo de los patrones electroforéticos de isoenzimas, generalmente esterasas, del depredador, de la presa y de las posibles presas alternativas (Walrant y Loareau 1995, Camara et al. 2003, Traugott 2003); la liberación de presas marcadas artificialmente, ya sea con colorantes (Hawkes 1972), tierras raras (Hamman y Iwannek 1981), isótopos radioactivos (McCarty et al. 1980) o isótopos estables (Nienstedt y Poehling 2004); y el uso de diferentes técnicas serológicas que conllevan la obtención de anticuerpos, policlonales o monoclonales, específicos frente a la especie presa en estudio, y su utilización sobre el contenido del tracto digestivo del depredador (Hagler et al. 1994, Hagler y Naranjo 1997, Symondson et al. 1997, Agustí et al. 1999a, Harwood et al. 2005).



Gracias al desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Ehrlich, 1989), se abre una nueva vía en el campo de la detección de presas. Mediante el diseño de cebadores específicos de una especie o grupo diana y la posterior amplificación del ADN de la presa por análisis “singleplex” (Agustí et al. 1999b, 2000, 2003a, 2003b, Zaidi et al. 1999, Chen et al. 2000, Hoogendoorn y Heimpel 2001), o más recientemente “multiplex” (Harper et al. 2005), va a ser posible visualizar la presencia de cantidades muy pequeñas de nuestro ADN diana y así evaluar el fenómeno de la depredación. Esta nueva técnica presenta una serie de ventajas respecto a aquellas que la habían precedido, y que poco a poco han supuesto su consolidación en el campo de los estudios de depredación *in situ* (King et al. 2008): El diseño y obtención de cebadores específicos es relativamente sencillo, no supone un coste económico muy elevado y la inversión en tiempo es en general mucho menor que la que por ejemplo supone la obtención de un anticuerpo monoclonal clásico (Symondson 2002); a día de hoy además, ya existen muchas secuencias de ADN de artrópodos en los bancos de datos que van a facilitar enormemente la obtención de nuevos marcadores moleculares; los protocolos utilizados son fácilmente reproducibles por lo que una vez obtenido un marcador molecular éste puede ser rápidamente transferido a cualquier laboratorio que lo necesite; la facilidad con la que pueden obtenerse marcadores específicos a distintos niveles taxonómicos, convierten este tipo de técnicas en la única aproximación viable, hasta la fecha, para el estudio de redes tróficas complejas, como pueda ser el caso de los depredadores generalistas, que utilizan multitud de presas distintas y a diferentes niveles de la cadena trófica (Symondson et al. 2002a, Sheppard y Harwood 2005, King et al. 2008). Por otro lado, esta técnica también presenta algunas limitaciones respecto a otras. Así, no se puede alcanzar un grado de especificidad tan elevado como por ejemplo con el uso de anticuerpos, donde éstos pueden llegar a diferenciar entre estados biológicos de desarrollo (Greenstone y Morgan 1989, Hagler et al. 1994, Greenstone 1995); los tiempos de detección aunque se han ido prolongando (Agustí et al. 2003b, Hoogendoorn y Heimpel 2001), no son tan largos como algunos obtenidos con anticuerpos monoclonales (Harwood et al. 2001, Schenk y Bacher 2004); cuando se pretende realizar estudios a gran escala con un solo tipo de presa, a día de hoy, sigue siendo más rápido y barato la utilización de anticuerpos para la detección mediante protocolo ELISA, que la utilización de la PCR (Symondson 2002, Hagler y Naranjo 2005). La utilización de

uno u otro tipo de técnicas en un estudio, vendrá determinada por las características de cada experimento diseñado.

En este capítulo, la aplicación del análisis PCR al contenido del tracto digestivo de especímenes de *P. cribata* y *P. rufipes* en campos de cítricos donde se ha simulado una alta infestación de *C. capitata*, va a permitir conocer de una manera rápida y directa si estos depredadores incorporan esta especie plaga en su dieta cuando hay disponibilidad de ella y de otras presas. Los resultados aquí obtenidos junto con los datos del comportamiento depredador conseguidos en laboratorio ayudarán a valorar mejor si estas especies pueden llegar a influir en las poblaciones de *C. capitata*.

## 4.2 Material y métodos

### 4.2.1 Puesta a punto del método

#### 4.2.1.1 Artrópodos

Para el desarrollo de los cebadores específicos frente a *C. capitata* se seleccionaron 42 especies de artrópodos, tanto fitófagos como depredadores (**Tabla 4.1**). La mayor parte de los artrópodos utilizados fueron capturados vivos en parcelas de cítricos localizadas en la provincia de Valencia (España). Las especies del género *Bactrocera*, exceptuando *Bactrocera oleae* (Gmelin), fueron capturadas en trampas pegajosas en Queensland (Australia) por personal del Department of Primary Industries and Fisheries (DPI & F). *Anastrepha suspensa* (Loew) fue recogida en huertos de Guayabas (*Psidium* spp.) en Florida. Como cepas de referencia de *C. capitata* se utilizaron la de la cría IVIA2002, y la Vienna-8 *tsl*, de las instalaciones de cría masiva de machos estériles en Caudete de las fuentes (Valencia).

#### 4.2.1.2 Diseño de los cebadores

**Cebadores específicos de *C. capitata*.** Para el diseño de los cebadores, se utilizaron secuencias del espaciador transcrito interno 1 (ITS1) de diferentes tefrítidos que fueron obtenidas de la base de datos GenBank [AF307848 (*C. capitata*), AF189690 (*Ceratitis rosa* Karsch), AF276515 (*Bactrocera cucurbitae* Coquillett) y AF276516 (*Bactrocera dorsalis* (Hendel))], y fueron alineadas con la aplicación informática GeneDoc (Nicholas et al. 1997) empleando el algoritmo MSA implementado en el software con un blossom 62 como scoring table, un coste constante de longitud de 20, un coste de apertura de gap 8 y un coste de extensión de gap 4. Se diseñaron tres cebadores (CcITS1-2dir, CcITS1-2rev y CcITS737) en las regiones no conservadas con otros tefrítidos del ITS1 de *C. capitata* utilizando el software OLIGO v4 (Rychlik 1992) (**Tabla 4.2**). En los ensayos realizados, se utilizaron dos combinaciones diferentes de los cebadores diseñados: CcITS1-2 (con CcITS1-2 dir y CcITS1-2 rev) y CcITS737 (con CcITS1-2dir y CcITS737rev).

**Cebadores Universales.** Se diseñaron un par de cebadores Univ18SrADN (18S\_lo1270 y 18S\_up1060) sobre una región altamente conservada obtenida del alineamiento de varias secuencias del 18S rADN de la base de datos GenBank

[AF096450 (*C. capitata*). AF012518 (*Cicindela sedecimpunctata* Klug (Coleoptera: Cicindelidae)), Z97594 (*Forficula auricularia* L. (Dermaptera: Forficulidae)), X89492 (*Leptothorax acervorum* (Fabricius) (Hymenoptera: Formicidae)), EF012870 (*Lasius* (Acanthomyops) *californicus* Wheeler (Hymenoptera: Formicidae)), AF487712 (*Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphidae)) y AF062961 (*Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae))] siguiendo un procedimiento similar al descrito anteriormente.

#### **4.2.1.3 Condiciones de amplificación**

Cada par de cebadores fue utilizado en un volumen de reacción de 20 µl que contenía: 300 nM dNTPs (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania), 1 x DNA pol buffer (Biotools B&M labs S.A., Madrid), 3mM MgCl<sub>2</sub> (Biotools), 0,75 u DNA polimerasa (Biotools) 10 pmol de cada cebador, y 10 ng de ADN total. El perfil de amplificación fue: un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, 40 ciclos de 94°C 30 segundos, 50°C 30 segundos, y 72°C 15 segundos, seguidos de una extensión final a 72°C durante 150 segundos. El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador de gradiente Mastercycler® ep-S (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa D-1 low EEO (Pronadisa, Sumilab S.L., Madrid) al 2% en un tampón 0,5x TBE. Los resultados eran visualizados bajo luz ultravioleta tras la tinción del gel con bromuro de etidio.

Grupo	Orden	Familia	Especie	Localidad	País	Código	Muestra en la Fig. 4.5	Espécímenes ensayados
Depredadores	Acari	Phytoseiidae	<i>Phytoseiulus persimilis</i> (Athias-Henriot)	IVIA Lab strain	España	Ppe	–	3
			<i>Amblyseius (Neoseiulus) californicus</i> (McGregor)	IVIA Lab strain	España	Nca	–	3
	Araneae	Gnaphosidae	<i>Trachyzelotes fuscipes</i> (Koch)	Olocau, VLC	España	Tfu	–	3
			<i>Nomisia exornata</i> (Koch)	Bétera, VLC	España	Nex	–	1
			<i>Erigone dentipalpis</i> (Wider)	Bétera, VLC	España	Ede	–	2
	Linyphiidae	Linyphiidae	<i>Meioneta fuscipalpis</i> (Koch)	Olocau, VLC	España	Mfu	–	3
			<i>Pelecopsis inedita</i> (Cambridge)	Olocau, VLC	España	Pin	–	2
			<i>Pardosa cribata</i> Simon	Bétera, VLC	España	Pc	1	>50
		Nemesiidae	<i>Nemesia dubia</i> Cambridge	Bétera, VLC	España	Ndu	–	2
		Thomisidae	<i>Xysticus bliteus</i> (Simon)	Bétera, VLC	España	Xbl	–	2
		Thomisidae	<i>Xysticus nubilus</i> Simon	Bétera, VLC	España	Xnu	–	2
		Zodariidae	<i>Zodariion</i> sp.	Moncada, VLC	España	Zpu	–	3
	Coleoptera	Cicindelidae	<i>Cicindela campestris</i> L.	Liria, VLC	España	Cca	6	2
		Carabidae	<i>Pseudoophonus (Pseudoophonus) rufipes</i> (De Geer)	Liria, VLC	España	Psr	7	20
		Coccinellidae	<i>Cryptolaemus montrouzieri</i> Mulsant	Almazora, CS	España	Cmo	8	5
		Dermaptera	<i>Forficula auricularia</i> L.	Moncada, VLC	España	Fau	4	20
	Hymenoptera	Anisolabidae	<i>Euborellia moesta</i> (Gené)	Liria, VLC	España	Emo	5	2
		Formicidae	<i>Formica rufibarbis</i> Fabricius	Liria, VLC	España	Fru	2	6
	Fitófagos	Acari	<i>Messor barbarus</i> (L.)	Liria, VLC	España	Mba	3	6
			<i>Tetranychus urticae</i> Koch	IVIA Lab strain	España	Tur	9	10
			<i>Panonychus citri</i> (McGregor)	Almussafes, VLC	España	Pci	–	2
	Collembola		<i>Entomobrya</i> sp.	Liria, VLC	España	Esp	–	2
	Diptera	Agromicidae	<i>Liriomyza</i> sp.	Liria, VLC	España	Lsp	–	2
			<i>Calliphora</i> sp.	Liria, VLC	España	Cal	–	1
		Cecidomyiidae	<i>Feltiella acarisuga</i> (Vallot)	La Mojonera, ALM	España	Fac	–	3
		Drosophilidae	<i>Drosophila melanogaster</i> Meigen	Moncada, VLC	España	DmY	–	5
				Moncada, VLC	España	Dmel	–	3
		Sciaridae	Undetermined species	Liria, VLC	España	Sci	–	2
		Syrphidae	<i>Episyrphus balteatus</i> (De Geer)	La Mojonera, ALM	España	Eba	–	2
		Tephritidae	<i>Anastrepha suspensa</i> (Loew)	Immokalee, FL	USA	Asu	13	5
			<i>Bactrocera (D.) oleae</i> (Gemlin)	Almussafes, VLC	España	Bol	14	2
			<i>Bactrocera tryoni</i> (Froggatt)	Cairns, QL	Australia	Btr	15	5
			<i>Bactrocera neohumeralis</i> (Hardy)	Cairns, QL	Australia	Bne	16	5
			<i>Bactrocera musae</i> (Tryon)	Cairns, QL	Australia	Bmu	17	5
			<i>Bactrocera frauenfeldi</i> (Schiner)	Cairns, QL	Australia	Bfr	18	5
			<i>Ceratitis rosa</i> Karsch	Hex River Valley	Sudáfrica	Cro	19	5
			<i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann)	IVIA Lab strain, Vienna-8 strain	España	Cc, Ccv8	20, 21	5, 3
	Hemiptera	Aphididae	<i>Myzus persicae</i> (Sulzer)	Picassent, VLC	España	Mpe	10	8
			<i>Aphis(Aphis) gossypii</i> Glover	Picassent, VLC	España	Ago	11	10
			<i>Aphis (Aphis) spiraeicola</i>	Picassent, VLC	España	Asp	12	7
	Lepidoptera	Gelechiidae	<i>Tuta absoluta</i> (Meyrick)	IVIA Lab strain	España	Tab	–	3
		Noctuidae	<i>Spodoptera exigua</i> (Hübner)	Lab strain, ALM	España	Sex	–	2
	Thysanoptera	Thripidae	<i>Frankliniella occidentalis</i> (Pergande)	IVIA Lab strain	España	Foc	–	4

**Tabla 4.1** Especies de artrópodos utilizadas para la evaluación de los cebadores diseñados específicos frente a *C. capitata*. Las especies han sido clasificadas en depredadores y fitófagos, incluyendo el orden y la familia al que pertenecen, así como la localidad y el país en el que fueron muestreadas. A cada una de ellas se la ha asignado un código de identificación.

Nombre del par de cebadores	Secuencia del cebador dir.	Secuencia del cebador rev.	Ta (°C)	Amplificación tamaño (bp)
CcITS1-2	TAA ATG GAT GAA AGA AGA TGA TG	GCC GAG TGA TCC ACC GCT TAG AG	55	333
CcITS737	TAA ATG GAT GAA AGA AGA TGA TG	TAG TCC AAC AAA AAC AGT AT	50	130
Univ18SrADN	AGT TAG AGG TTC GAA GGC GAT CAG	TGG TAA GTT TTC CCG TGT TGA GTC	55	233

Ta, temperatura de anillamiento

**Tabla 4.2** Secuencias de los cebadores (5'-3') y condiciones de la PCR.

#### 4.2.1.4 Extracción del ADN

Todos los especímenes utilizados, tanto para el diseño de los marcadores como para los posteriores ensayos de laboratorio y campo (**Tabla 4.1**), fueron previamente congelados a -80°C durante al menos 20 minutos. La extracción del ADN total se llevó a cabo siguiendo los protocolos de Latorre et al. (1986) y/o “Salting-out” (Sunnucks y Hales 1996). En el caso de *P. cribata* las extracciones se realizaron utilizando sólo el opistosoma de la araña, ya que es en esta parte donde más se ramifica el tracto digestivo y por lo tanto donde más proporción de ADN de la presa respecto al del depredador debería haber. Con *P. rufipes*, para minimizar la cantidad de ADN del depredador, se diseccionó cada espécimen, se extrajo el tracto digestivo (**Fig. 4.1**) y se utilizó sólo éste en el protocolo de extracción. En ambos casos se siguió el protocolo “Salting-out”. El ADN total extraído se disolvió en 20-100 µl de LTE-R (10mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0; 6 µg/ml RNasa A), dependiendo del tamaño del espécimen utilizado. Cada muestra de ADN era verificada por electroforesis en gel de agarosa al 1%.



**Figura 4.1** Extracción del tracto digestivo de *P. rufipes* después de ser alimentado con una pupa de *C. capitata*.

#### 4.2.1.5 Pruebas de reactividad cruzada y sensibilidad

La especificidad de cada par de cebadores CcITS diseñado fue evaluada con varios individuos de las dos líneas de *C. capitata*, varias especies filogenéticamente cercanas, y un amplio grupo de artrópodos, potenciales presas y otros depredadores, que pueden darse en los suelos de cítricos de la zona en estudio (**Tabla 4.1**). La inclusión en este estudio de varias especies de tefrítidos, consideradas exóticas en España, valida la utilización de estos marcadores en otras regiones del planeta donde *C. capitata* coexiste con estos tefrítidos.

La sensibilidad de nuestros marcadores fue determinada mediante su evaluación con diluciones seriadas 1:10 del ADN total de *C. capitata*, con una dilución en origen de 10 ng/μl y una dilución final de 1:10<sup>10</sup>.

### 4.2.2 Detección de la depredación de *Ceratitis capitata* por *Pardosa cribata* y *Pseudophonus rufipes*

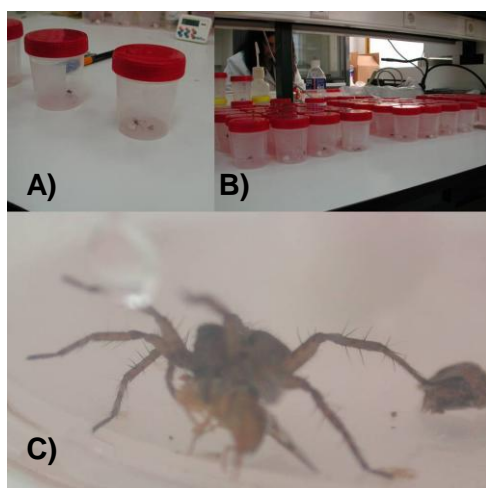
#### 4.2.2.1 Curvas de degradación y tiempos de detección 50

##### 4.2.2.1.1 *Pardosa cribata*

Los adultos de *P. cribata* utilizados en los experimentos que a continuación se detallan se capturaron en parcelas de cítricos cercanas al IVIA. Cada araña fue introducida de manera individualizada en un bote de plástico de 150 ml de volumen (**Fig. 4.2<sub>A</sub>**) y se mantuvo en ayuno (con suministro de agua a través de un algodón humedecido) durante un periodo de 7 días a 25°C y 16:8 h (L:O), para vaciarle el tracto digestivo. Tras este periodo, a cada araña se le ofreció como presa un individuo adulto de *C. capitata* procedente de la colonia IVIA2002. Una vez la presa era capturada se dejaba que la araña se alimentara de ésta durante 3 horas (tiempo de predigestión e ingestión) (**Fig. 4.2<sub>C</sub>**). Transcurrido este tiempo, los restos de la presa aun no consumidos eran retirados y comenzaba a contabilizarse el tiempo de digestión del depredador. Las arañas se dividieron en lotes (**Fig. 4.2<sub>B</sub>**) y a cada uno de éstos se les dejó un tiempo diferente de digestión, en condiciones de 25°C y 16:8 h (L:O) y con sólo suministro de agua, hasta el momento de su congelación (a -80°C). Los tiempos de digestión ensayados fueron: 0 h (las arañas de este lote eran congeladas tras retirar los restos de presa después de las 3 horas de ingestión), 6,

12, 24, 36, 48, 72 y 96 h. Para cada uno de los tiempos se ensayaron 20 arañas (excepto en el lote de 96 h en el que se dispuso de 19 individuos). Se realizó un lote adicional de arañas ( $n = 20$ ) en el que después de los 7 días de ayuno no se les ofreció presa y fueron congeladas. Las arañas de este lote se utilizaron como controles negativos de la PCR.

El ADN de cada extracción de araña fue analizado por triplicado mediante PCR, considerando positiva la detección si al menos una de las tres repeticiones daba positiva (Agustí et al 2003a). Todas las muestras que dieron negativo en las tres pruebas se probaron con el par de cebadores universales para verificar si el resultado negativo era debido a la ausencia de ADN de *C. capitata* o si se debía a un fallo de la PCR.



**Figura 4.2** Ensayo de obtención de curvas de degradación del ADN de la presa. **A)** Botes de plástico en los que se le ofrece la presa al depredador, **B)** Lotes realizados para congelar a los distintos tiempos de digestión y **C)** *P. cribata* alimentándose de un adulto de *C. capitata* (fase de predigestión e ingestión).

Para cada par de cebadores, la proporción de muestras que dieron positivo para los distintos tiempos de digestión se sometió a un análisis de regresión Probit con la aplicación Proc Probit en PC SAS versión 9.1.3 (SAS 2004). Para determinar el ajuste de los datos al modelo Probit, se realizó un test Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ). Se determinaron los tiempos de detección 50 (tiempo post-digestión en el que aún se puede detectar un 50% de muestras positivas) (Greenstone y Hunt 1993, Greenstone et al. 2007). De manera adicional, se realizó un test  $\chi^2$  de paralelismo



con la finalidad de poder evaluar si existían diferencias significativas entre los datos de los dos pares de cebadores. Para ello, se comprobó si las pendientes y ordenadas en el origen de los ajustes de cada conjunto de datos eran iguales o no.

#### **4.2.2.1.2 *Pseudoophonus rufipes***

Para conocer la curva de degradación de *P. rufipes* con *C. capitata* como presa, se recolectaron especímenes adultos en parcelas de cítricos, instalando en éstas, trampas de gravedad en las que el bote de captura no se cebaba con líquido conservante. Los individuos capturados se llevaron a laboratorio y se dejaron 2 días en ayuno en las mismas condiciones descritas anteriormente para *P. cribata*. Después del periodo de ayuno se le ofreció a cada adulto una pupa de 2 días de *C. capitata*. Con la finalidad de estandarizar la cantidad de presa ingestada, tan sólo se utilizaron aquellos especímenes que se alimentaron de la pupa durante un periodo 15 min, tiempo tras el cual los posibles restos que quedaran de ésta eran retirados. En ese momento se comenzaba a contabilizar el tiempo de digestión. Los tiempos de digestión ensayados fueron 0 h (n = 15), 1 h (n = 16), 6 h (n = 15), 12 h (n = 17), 24 h (n = 16), 48 h (n = 18), 72 h (n = 16). Adicionalmente se realizó la extracción de ADN total de 11 especímenes, a los que tras el periodo de ayuno no se les ofreció ninguna pupa. Éstos fueron utilizados como controles negativos de la PCR.

La obtención de la curva de degradación y tiempo de detección 50 se realizó con el par de cebadores CcITS737. Los datos obtenidos fueron tratados de la misma manera descrita para *P. cribata*.

Para poder constatar si existían diferencias significativas entre los tiempos de detección 50 de ambos depredadores se realizó un test  $\chi^2$  de paralelismo en el que se compararon los datos obtenidos para cada depredador.

#### **4.2.2.2 Detección en campo**

##### **4.2.2.2.1 *Pardosa cribata***

El ensayo de campo se llevó a cabo a inicios del mes de julio de 2007 en la parcela comercial de clementinos situada en Bétera, donde se había realizado el estudio de artrópodos depredadores descrito en el primer capítulo, y en la que se había registrado una elevada actividad poblacional de *P. cribata* durante los tres años de muestreos. En esta parcela se liberaron de forma manual, a primera hora de la

mañana, aproximadamente 40.000 pupas a punto de emerger, de la línea estéril Vienna-8 *tsI*, simulando una infestación natural grave (R. Argilés e I. Pla, TRAGSA, comunicación personal). Se decidió utilizar pupas a punto de emerger para conseguir en la parcela poblaciones elevadas de adultos recién emergidos. Una vez realizada la infestación, transcurridas 24, 48, 72, 96 h y 7 días, se capturaron manualmente en la zona central de la parcela 20 especímenes diarios de adultos de *P. cribata* (Fig. 4.3). Todos los individuos recolectados se llevaron inmediatamente al laboratorio y fueron congelados a -80°C para realizar las posteriores extracciones del ADN total. El ADN extraído del opistosoma de cada araña fue analizado por triplicado mediante PCR, utilizando el par de cebadores CcITS737. Finalmente se obtuvo el porcentaje de muestras que dieron un resultado positivo para cada día de capturas así como para el total del ensayo. Con el fin de conocer la proporción diaria de emergencia de adultos de la cepa Vienna-8, se colocaron en la parcela 4 trampas McPhail modificadas, con cebo trimedlure® y una pastilla de insecticida diclorvos®. Durante todo el periodo de ensayo se contabilizó el número diario de capturas de adultos estériles en estas trampas y se estimó el número de moscas por trampa y día (MTD).



- Zona de liberación de pupas
- Zona de captura de depredadores

**Figura 4.3** Parcela de Bétera en la que se realizaron los ensayos de detección de depredación en campo con *P. cribata* y *P. rufipes*.

#### 4.2.2.2.2 *Pseudoophonus rufipes*

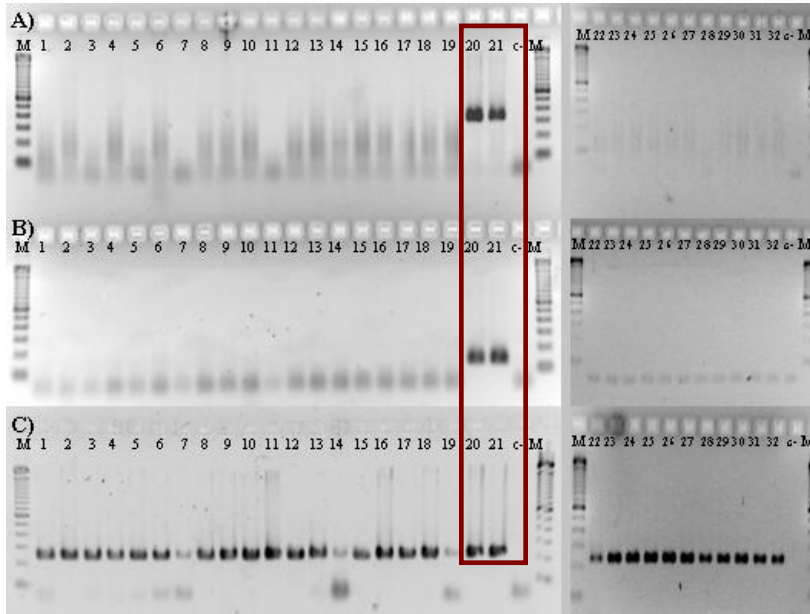
El ensayo de campo se llevó a cabo en la segunda quincena de septiembre de 2007 en la parcela de Bétera, donde se había registrado una elevada actividad de este carábido con un pico poblacional a inicios del otoño. Como *P. rufipes* mostró una mayor eficacia en laboratorio depredando el estado de pupa, la parcela se infestó con 40.000 pupas de aproximadamente dos días de edad de la línea estéril Vienna-8 *tsl*. Las pupas se liberaron de forma manual distribuyéndose homogéneamente por toda la superficie de liberación determinada en la parcela. En la zona central de ésta se instalaron 8 trampas de gravedad sin mezcla conservante (**Fig. 4.3**). Transcurridas 24, 48, 72, 96 h, 6, 7 y 8 días se recogieron vivos, a primera hora de la mañana, los carábidos capturados en las trampas. Éstos se llevaron inmediatamente al laboratorio y se congerlaron a -80°C. El ADN extraído del tracto digestivo de cada carábido se analizó por triplicado mediante PCR, utilizando el par de cebadores CclTS737. Aquellas muestras que dieron amplicones poco perceptibles fueron analizadas en una cuarta PCR ajustando las concentraciones del ADN. Como el número de carábidos capturados durante el ensayo no fue muy elevado ( $n = 36$ ), tan sólo se estudió el porcentaje total de individuos que dieron positivo en la detección de ADN de *C. capitata*.

## 4.3 Resultados

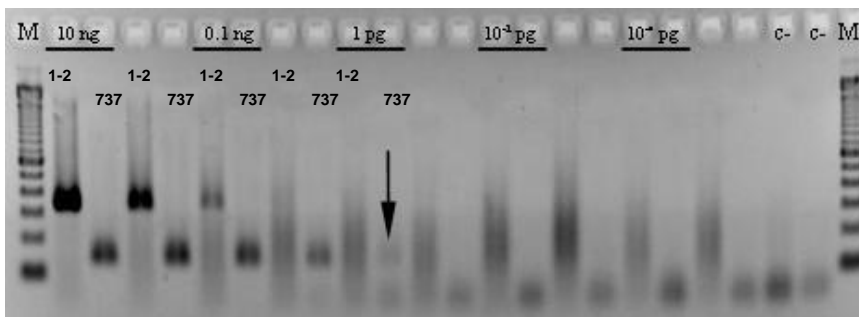
### 4.3.1 Diseño de los marcadores y test de reactividad cruzada

En primer lugar se diseñó el par de cebadores CcITS1-2 (CcITS1-2 dir y CcITS1-2 rev) sobre el alineamiento de la región ITS-1. CcITS1-2 rev se diseñó sobre una región conservada del 5.8S rADN cercana al final del ITS-1. Este par de cebadores amplificaba un fragmento de 330 pb en la presencia de ADN de *C. capitata*, mientras que este amplicón no se daba con el resto de tefrítidos ni en los otros artrópodos ensayados. (**Fig. 4.4<sub>A</sub>**). Sin embargo, CcITS1-2 producía amplificado inespecífico de fondo en todas las muestras, exceptuando los controles negativos. Este resultado probablemente sea debido a que el cebador CcITS1-2 rev, diseñado sobre una región conservada, era capaz de unirse al ADN de los artrópodos no diana. Para solucionar este inconveniente se diseñó un tercer cebador (CcITS1-737) sobre una región del ITS-1 específica de *C. capitata*, que en combinación con el cebador CcITS1-2 dir (CcITS737 par de cebadores), daba un fragmento amplificado de 130 pb solamente detectable sobre ADN de *C. capitata* (**Fig. 4.4<sub>B</sub>**). El par de cebadores Univ18SrADN se utilizó para demostrar la especificidad frente a *C. capitata* de los cebadores ITS-1 diseñados (**Fig. 4.4<sub>C</sub>**), así como para diferenciar entre negativos en la PCR debidos a la ausencia del ADN diana y negativos debidos a la ausencia de cualquier tipo de ADN o al funcionamiento incorrecto de la PCR.

En la prueba de sensibilidad, el par de cebadores CcITS737 fue más sensible, de manera que con éste se pudo amplificar ADN de *C. capitata* hasta concentraciones de 1 pg (**Fig. 4.5**).



**Figura 4.4** Patrón de amplificación de los dos pares de cebadores ITS específicos frente a *C. capitata* y del par de cebadores control 18SrADN al ser probados frente a diferentes artrópodos. **A)** Amplificación específica del CcITS1-2. **B)** Amplificación específica del CcITS1-737. **C)** Amplificación control con 18SrADN; **M** corresponde a la escalera de marcadores de 100 pb; **c-** corresponde al control negativo de la PCR; las muestras **1-32** se corresponden a las especies citadas en la **Tabla 4.1**, cuyos códigos respectivos son (Pc, Fru, Mba, Fau, Emo, Cca, Psr, Cmo, Tur, Mpe, Ago, Asp, Asu, Bol, Btr, Bne, Bmu, Bfr, Cro, Cc y Ccv8). Los ADNs de la especie *C. capitata* y el control negativo han sido destacados sobre los demás.



**Figura 4.5** Test de sensibilidad de los dos pares de cebadores CcITS ('1-2' y '737') con diluciones seriadas de ADN de *C. capitata*; **M** corresponde a la escalera de marcadores de 100 pb; **c-** corresponde al control negativo de la PCR.

## 4.3.2 Tiempos de detección

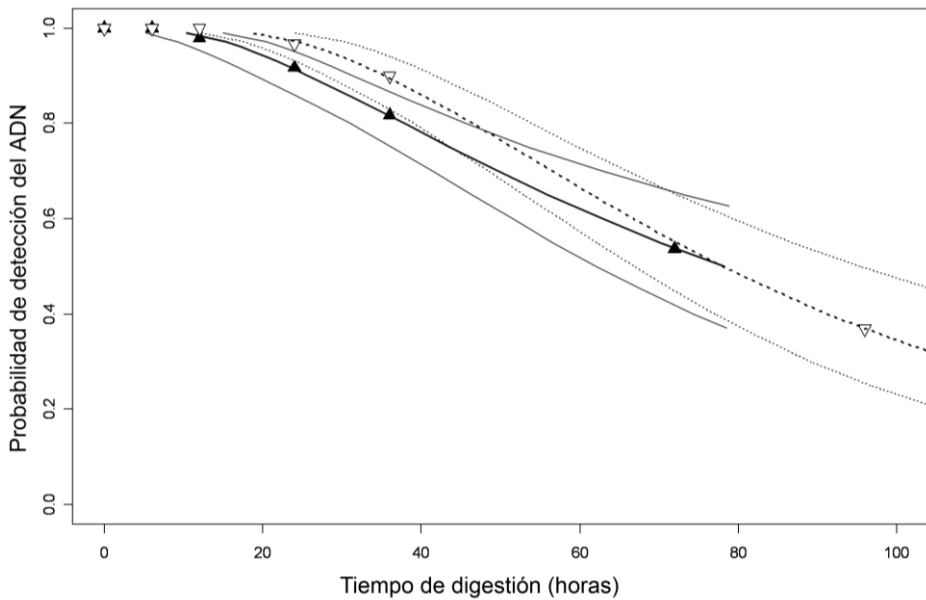
### 4.3.2.1 *Pardosa cribata*

La proporción de detecciones positivas para los distintos tiempos de digestión ensayados cumplía los requisitos de ajuste del modelo Probit para los dos pares de cebadores ( $\chi^2 = 0,2055$ ;  $gl = 3$ ;  $P = 0,977$  para CcITS1-2 y  $\chi^2 = 0,1519$ ;  $gl = 3$ ;  $P = 0,985$  para CcITS737) (**Fig. 4.6**). Los tiempos de detección 50 fueron de 78,25 h y 78,08 h para CcITS1-2 y CcITS7373 respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre estos dos valores. De hecho, al realizar el test de paralelismo entre ambos conjuntos de datos, tampoco se encontraron diferencias significativas ( $\chi^2 = 1,9407$ ,  $gl = 1$ ,  $P = 0,1636$ ).

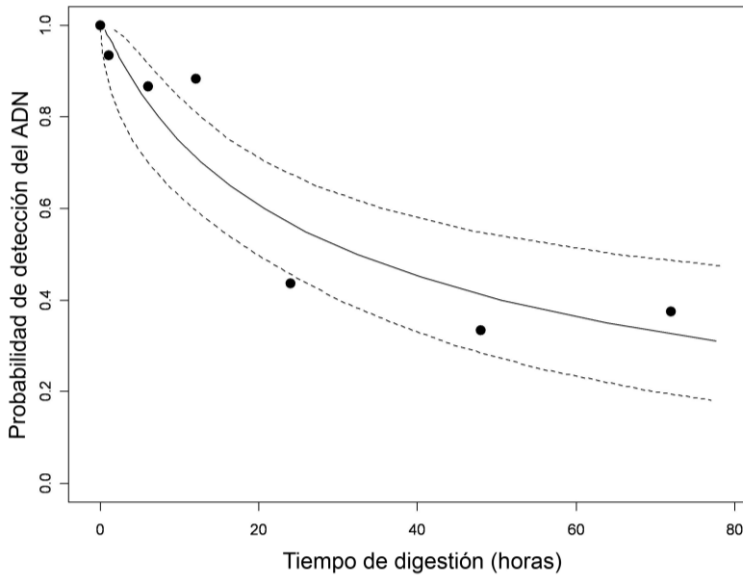
### 4.3.2.2 *Pseudoophonus rufipes*

La proporción de detecciones positivas para los distintos tiempos de digestión ensayados cumplía los requisitos de ajuste del modelo Probit ( $\chi^2 = 5,3756$ ;  $gl = 4$ ;  $P = 0,2509$ ) (**Fig. 4.7**). El tiempo de detección 50 estimado fue de 32,33 h.

Al comparar los tiempos de detección obtenidos con *P. cribata* (CcITS1-737) y con *P. rufipes* (CcITS1-737), se obtuvieron diferencias significativas tanto en las pendientes como en las ordenadas en el origen de las curvas estimadas para cada conjunto de datos ( $\chi^2 = 19,9284$ ;  $gl = 1$ ,  $P < 0,0001$  para la prueba de pendientes y  $\chi^2 = 63,3726$ ;  $gl = 2$ ;  $P < 0,0001$  para la prueba de ordenadas en el origen) Por lo tanto, podemos concluir que los tiempos de detección 50 estimados para cada depredador fueron significativamente diferentes.



**Figura 4.6** Curvas de probabilidad de detección de ADN de *C. capitata* en *P. cribata* para los diferentes tiempos de digestión. Las líneas indican el ajuste al modelo probit con sus intervalos de confianza 95%. Los triángulos negros y las líneas continuas corresponden al par de cebadores CcITS1-2 mientras que los triángulos blancos y líneas discontinuas corresponden al CcITS1-737.

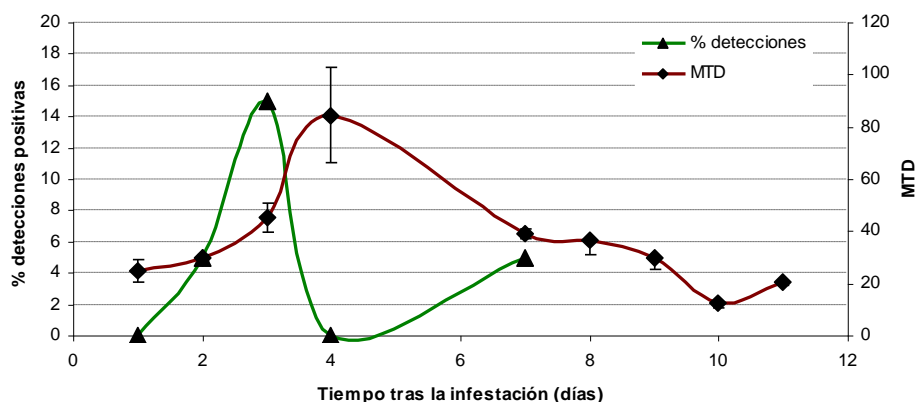


**Figura 4.7** Curva de probabilidad de detección de ADN de *C. capitata* en *P. rufipes* para los diferentes tiempos de digestión utilizando el par de cebadores CcITS1-737. Las líneas indican el ajuste al modelo probit con sus intervalos de confianza 95%.

### 4.3.3 Ensayo de campo

#### 4.3.3.1 *Pardosa cribata*

En la prueba de campo diseñada se analizaron un total de 100 especímenes adultos de *P. cribata*. El 5% de estas arañas dio un resultado positivo en la detección de ADN de *C. capitata*. Al analizar estos datos por día de muestreo (**Fig. 4.8**), se comprobó que esta proporción se incrementaba hasta un 15% de detecciones positivas 72 h después de la infestación artificial. El número de adultos estériles capturados en las trampas situadas en la parcela de ensayo fue incrementándose de manera gradual desde las 24 h después de la infestación hasta las 96 h, donde se registró el máximo de capturas ( $84,2 \pm 18,3$  MTD). De aquí en adelante, el número de moscas capturadas disminuyó hasta estabilizarse en una cifra de aproximadamente 25 MTD.



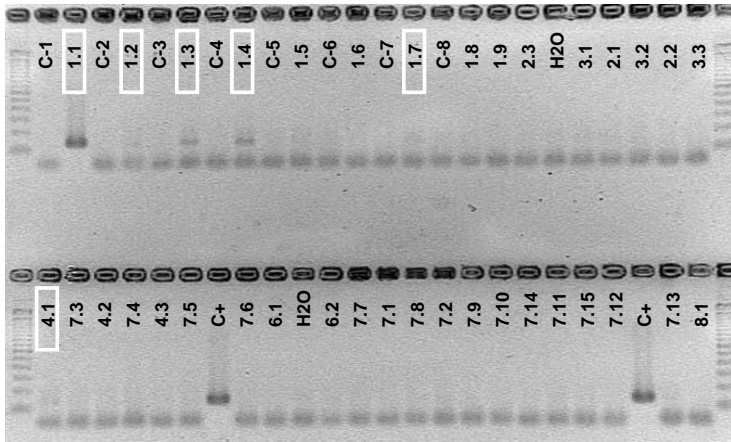
**Figura 4.8** Porcentaje de arañas que dieron positivo en el ensayo de campo con el par de cebadores CcITS1-737, y promedio ( $\pm$  ES) del número de adultos estériles capturados por trampa y día (MTD).

#### 4.3.3.2 *Pseudoophonus rufipes*

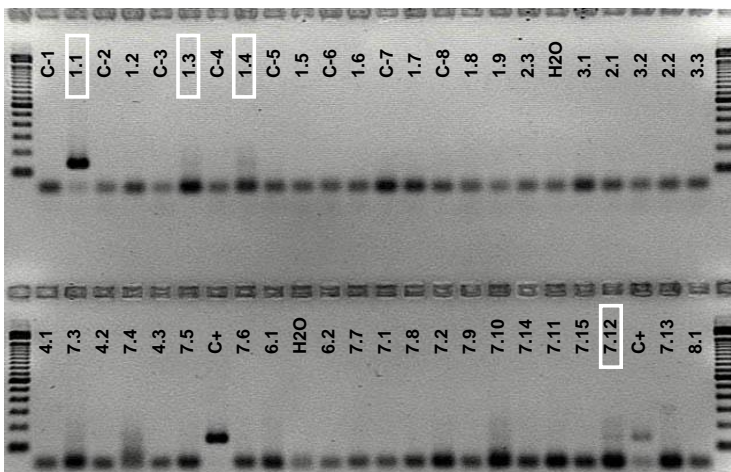
En el ensayo de campo se analizaron un total de 36 especímenes adultos. El 22,9% de los carábidos dieron positivo en la detección de ADN de *C. capitata* (**Fig. 4.9**).



A)

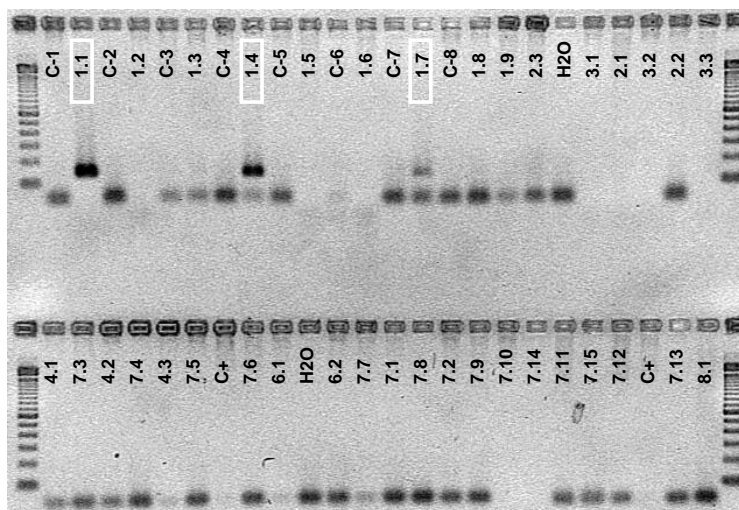


B)

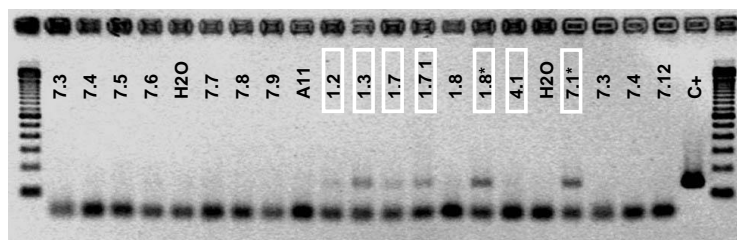


**Figura 4.9** Amplificaciones positivas de *C. capitata* con el marcador CcITS737 sobre el contenido del tracto digestivo de 36 especímenes de *P. rufipes* capturados en una parcela comercial de clementinos tras una infestación artificial con pupas de *C. capitata*. Los carábidos fueron capturados 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 8 días después de la infestación. Cada muestra está etiquetada con el día de captura y número de espécimen. Se utilizó la escalera de marcadores de 100 pb; C-i, controles negativos de la PCR. En blanco se encuadran aquellas muestras consideradas como detección positiva. **A)** PCR1y **B)** PCR2.

C)



D)



**Figura 4.9 (cont.)** Amplificaciones positivas de *C. capitata* con el marcador CcITS737 sobre el contenido del tracto digestivo de 36 especímenes de *P. rufipes* capturados en una parcela comercial de clementinos tras una infestación artificial con pupas de *C. capitata*. Los carábidos fueron capturados 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 8 días después de la infestación. Cada muestra está etiquetada con el día de captura y número de espécimen. Se utilizó la escala de marcadores de 100 pb; C-i, controles negativos de la PCR; \*las muestras 1.8 y 7.1 se analizaron a dos concentraciones diferentes de ADN. En blanco se encuadran aquellas muestras consideradas como detección positiva. **C)** PCR3 y **D)** PCR4.

## 4.4 Discusión

Se ha aplicado con éxito una técnica post-mortem para la evaluación de la depredación de la mosca mediterránea de la fruta ejercida por los depredadores polífagos presentes en los suelos de cítricos. Gracias a ésta, se ha demostrado que *P. cribata* y *P. rufipes* pueden utilizar como presa a *C. capitata* en condiciones de campo, donde existe una gran variedad de presas alternativas y por lo tanto, el depredador tiene la capacidad de elección (Symondson 2002, Symondson et al. 2002a). Además, esta es la primera vez que se aplica este tipo de técnicas en la evaluación de la depredación de tefrítidos en condiciones de campo, y es uno de los pocos estudios que hasta la fecha, utilizan estas técnicas para el estudio de los sistemas depredador-presa directamente en parcelas comerciales (Hoogendoorn y Heimpel 2002, Agustí et al. 2003b, Dodd et al. 2003, Kaspar et al. 2004, Harper et al. 2005 y Ma et al. 2005).

Los largos tiempos de detección 50 obtenidos en laboratorio para ambos depredadores y la especificidad demostrada de los dos pares de cebadores diseñados validan la aplicación de la técnica en condiciones de campo.

El tiempo de detección 50 obtenido para *P. rufipes* (32,3 h) se encuentra entre los valores registrados para otros carábidos en otros estudios realizados (entre 18 y 88,5 h) (Sheppard et al. 2005, Harper et al. 2005, Juen y Traugott 2007). De la misma manera, los valores de detección 50 obtenidos con *P. cribata* (aprox. 78 h) también se ubican en el rango de tiempos citados en otras especies de araña (ej. 96 h [Harwood et al. 2001] ó 105.4 h [Ma et al. 2005]).

Los cebadores diseñados presentan varias características que explicarían los largos tiempos de detección obtenidos en este estudio:

- Éstos se diseñaron sobre una región multicopia del genoma. Los genes ribosomales 18S, 5.8S, 28S y los espaciadores transcritos internos ITS1 y ITS2 aparecen en clústers repetidos en tándem en el genoma nuclear de eucariotas (Hoy 2003, Beebe y Rowe 2004) en cientos o miles de copias. Se ha demostrado que los marcadores diseñados sobre regiones multicopia del ADN, ya sean nucleares o mitocondriales, ofrecen tiempos de detección mucho más largos que aquellos obtenidos con marcadores diseñados sobre regiones monocopia (Zaidi et al 1999, Chen et al. 2000, Agustí et al. 2003b).

- Los amplicones de mayor tamaño son más fácilmente degradables en los procesos de digestión que aquellos de menor tamaño, conllevando tiempos de detección menores (Agustí et al. 1999b, 2000, 2003b, Zaidi et al 1999, Chen et al. 2000, Hoogendoorn y Heimpel 2001). En el presente trabajo se utilizaron pares de cebadores que amplifican fragmentos de 130 pb y 330 pb cada uno de ellos. Estos tamaños de amplicón se encuentran en el rango recomendado (King et al. 2008). Cuando se comparó con *P. criбата* los tiempos de detección de los dos pares de cebadores diseñados, aunque no se observaron diferencias significativas entre ambos, sí que se intuye una tendencia a tiempos de detección más prolongados con el par de cebadores que amplifica un fragmento de menor tamaño.
- La cantidad de ADN ingerido también puede influir en los tiempos de detección de éste (de León et al. 2006), aunque por otro lado, hay estudios en los que no se pudo encontrar esta relación (Zaidi et al. 1999, Hoogendoorn y Heimpel 2001, Juen y Traugott 2005). En el sistema estudiado en el presente trabajo, la presa utilizada es de un tamaño considerable comparada con el de sus depredadores, especialmente respecto a *P. criбата*, por lo que la ingesta de un solo individuo supone la adquisición de una gran cantidad de ADN diana.
- Parece existir una correlación entre sensibilidad y eficiencia en la detección, de manera que una mayor sensibilidad implica una mayor eficiencia en la detección de la presa. De León et al. (2006) obtuvieron una sensibilidad de 6,0 pg para un marcador sobre la subunidad mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) y de 25,0 pg para un segundo marcador sobre la COII. En dicho trabajo se logró una mayor eficiencia en la detección para el marcador COI independientemente del tamaño del fragmento amplificado. En nuestro estudio, obtuvimos una sensibilidad de 100 pg para el par de cebadores CcITS1-2 y de 1pg para el par de cebadores CcITS737.
- Además, en nuestro trabajo se ha podido comprobar que el diseño específico de los cebadores es crucial para el éxito de la amplificación, independientemente de otros factores como puedan ser el tamaño del fragmento amplificado. En general, el par de cebadores CcITS737 que daba

el amplicón de menor tamaño, producía bandas más claras que el par de cebadores CcITS1-2. Este resultado es opuesto al obtenido por Juen y Traugott (2005) en el que el par de cebadores con amplicones de menor tamaño era el que amplificaba unas bandas menos claras. Nuestro resultado probablemente se deba a las amplificaciones inespecíficas que producía el cebador CcITS1-2rev.

Algunos de los trabajos publicados recientemente en este campo desaconsejan la utilización de marcadores sobre las regiones ITS en favor de aquéllos diseñados sobre las regiones COI y COII del ADN mitocondrial (Greenstone 2006, King et al. 2008). Las regiones ITS presentan un grado de variabilidad muy elevado, tanto interespecífica como intraespecífica e incluso intraindividuo (Wesson et al. 1992, Parkin y Butlin 2004). Por un lado es necesario que la región del ADN donde se van a diseñar los cebadores sea poco conservada para que luego seamos capaces de diferenciar entre especies (Hackett et al. 2000). Por otro lado, un exceso de variabilidad en la región diana de nuestros cebadores puede provocar que no seamos capaces de amplificar todas las poblaciones de nuestra especie objetivo, o que por el contrario obtengamos amplificaciones no deseadas en otras especies. A pesar de estos riesgos potenciales, en nuestro caso no obtuvimos amplificaciones en ninguna de las 40 especies de artrópodos ensayadas y además, fuimos capaces de amplificar con éxito todos los individuos evaluados de dos cepas de *C. capitata* no relacionadas, la línea IVIA2002 y la línea estéril Viena-8. La elección de esta región a la hora de diseñar los cebadores se basó en su presencia en cientos o miles de copias en el genoma y en la gran disponibilidad de secuencias de esta región en las bases de datos. Aparte de este trabajo, existen otros estudios en el que aplican con éxito marcadores moleculares diseñados sobre la región ITS1 (Hoogendoorn y Heimpel 2001, Ma et al. 2005).

Los tiempos de detección más prolongados obtenidos con *P. cribata* respecto a *P. rufipes* entran dentro de lo esperado. Se ha comprobado en otros estudios que existe una relación directa entre tipos de ingestión ejercidos por los depredadores y tiempos de detección (Greenstone et al. 2007). Además, el modo de vida y hábitos alimenticios de las arañas, hacen que su aparato digestivo esté diseñado para que éstas sobrevivan durante largos periodos de ayuno (Greenstone y Bennett 1980, Harwood et al. 2001), ralentizando los procesos de digestión y por lo tanto de degradación del ADN ingerido.

El porcentaje de individuos que dieron positivo en la detección del ADN diana fue menor en *P. cribata* (5%) que en *P. rufipes* (23%). Una de las principales causas de este resultado probablemente sea que el estado de desarrollo al que ataca la araña (adulto recién emergido) es de corta duración y por lo tanto, la probabilidad del encuentro entre el depredador y su presa es mucho menor que en el caso de *P. rufipes*, que puede utilizar como presa las pupas. Esta hipótesis se ve reforzada al observar los resultados del ensayo de *P. cribata* analizado por días de capturas. En éste, el pico de detecciones positivas (15%) se obtiene 72 h después de la infestación, coincidiendo con el momento de mayor emergencia de adultos, según los datos de capturas obtenidos de las trampas colocadas en la parcela. En éstas, los máximos de MTD se obtuvieron 24 horas después del pico máximo de detecciones positivas.

Aunque *P. cribata* mostró una eficiencia algo menor en la depredación tanto en campo como en laboratorio que *P. rufipes*, su actividad estacional se prolonga en el tiempo mucho más que la del carábido. Por lo tanto, *P. cribata* y *C. capitata* coexisten en los suelos de cítricos durante más tiempo, lo que compensa con creces de manera numérica su menor eficiencia respecto al carábido. Además, los valores de depredación registrados con este tipo de técnicas no son capaces de detectar otro tipo de acciones que afecten a la presa pero no supongan una ingestión de ésta. Un ejemplo de estas acciones podría ser la “sobreexplotación”. En los ensayos de laboratorio realizados con este depredador se comprobó que *P. cribata* mataba muchas más presas de las que luego consumía. Esta cualidad de las arañas implica que los valores reales de depredación en campo pueden ser mayores que los registrados por técnicas de detección de presas. En diferentes trabajos realizados con este tipo de técnicas, se alerta también de la posible sobrevaloración de la depredación al no considerar otros comportamientos inherentes a los depredadores generalistas, tales como la depredación secundaria o los hábitos carroñeros, que nos van a proporcionar falsos positivos (Harwood et al. 2001, Foltan et al. 2005, Juen y Traugott 2005, Sheppard et al. 2005). Aunque los hábitos carroñeros son impropios de las arañas, de hecho en nuestro estudio *P. cribata* no mostró interés por los estados inmóviles de *C. capitata*, sería interesante profundizar más en este tipo de relaciones tróficas para poder precisar más la acción de estos depredadores.

Por último, cabe destacar la gran complementariedad que muestran las dos especies de depredadores estudiadas en cuanto a su acción frente a esta plaga. Los estados

biológicos de la mosca a los que ataca cada depredador son diferentes. *Pardosa cribata* prefiere los adultos recién emergidos, aunque también puede alimentarse de larvas de 3º estadio, mientras que *P. rufipes* utiliza principalmente como presa las pupas y larvas de 3º estadio. Ambos depredadores presentan la actividad depredadora en momentos distintos del día, *Pseudoophonus rufipes* es de hábitos nocturnos mientras que *P. cribata* es de hábitos diurnos, y de esta manera, abarcan entre los dos todo el periodo potencial de actividad de su presa. La actividad estacional de cada uno también muestra patrones diferentes. Así, tal y como ya se ha descrito, *P. cribata* presenta actividad durante todo el año con un máximo desde inicios de la primavera hasta mediados del otoño, que coincidirá con la emergencia de adultos de aquellas pupas que sobreviven al invierno, con la de las primeras generaciones de moscas en variedades de naranja tardías, y con la de aquellos adultos que emerjan a inicios de otoño en parcelas plantadas con variedades de mandarina extra-tempranas. En cambio, *P. rufipes* presenta una estacionalidad más acusada con dos picos de actividad muy marcados, uno a finales de la primavera-inicios del verano y otro en otoño, siendo este segundo pico de actividad el que pueda incidir más efectivamente sobre esta plaga, al coincidir con la presencia de pupas en parcelas con variedades extra-tempranas y tempranas de mandarina.

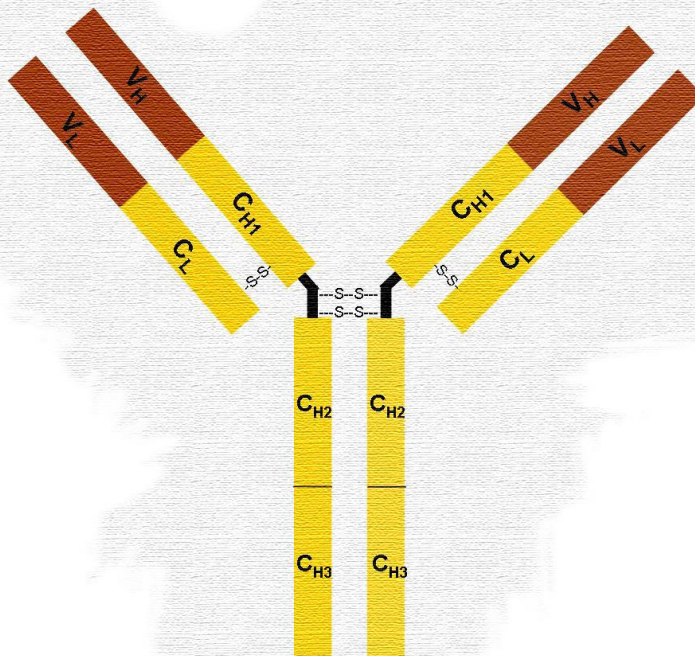
Como ya se ha mencionado con anterioridad, *P. cribata* y *P. rufipes* se han estudiado como especies modelo del complejo de depredadores polífagos que se da en suelos de cítricos del mediterráneo español. El principal activo de este complejo es precisamente la combinación de una gran variedad de estrategias depredadoras, preferencias por presas y estados biológicos de éstas, actividades estacionales y circadianas, que ya queda en evidencia al estudiar a tan sólo dos representantes de este complejo. Además, por los resultados obtenidos en éste y otros trabajos, mediante una manipulación adecuada del medio en el que se encuentran, como por ejemplo a través del manejo de las cubiertas vegetales, se podría optimizar los procesos ecológicos que favorecen sus poblaciones (Riechert y Bishop 1990, Samu et al. 1999). De esta manera, a través del manejo de sus poblaciones se podría mejorar el control biológico de aquellas especies plaga que, como *C. capitata*, están expuestas a su acción conjunta.

Para conocer más a fondo la acción de este complejo de depredadores frente a *C. capitata*, el siguiente paso recomendado sería realizar una evaluación a gran escala, en toda la región citrícola en estudio, de la acción ejercida por el mayor número

posible de especies que componen dicho complejo. Para este tipo de ensayos a gran escala donde deben analizarse un número de depredadores muy elevado, la aplicación de anticuerpos monoclonales específicos frente a *C. capitata* se nos presenta como una alternativa probablemente menos costosa, tanto desde el punto de vista económico como del manejo de muestras en el laboratorio, al cada vez más extendido uso de marcadores moleculares (Sheppard y Harwood 2005, Hagler y Naranjo 2005).



## 5 Detección de depredación de *Ceratitis capitata* por técnicas inmunológicas





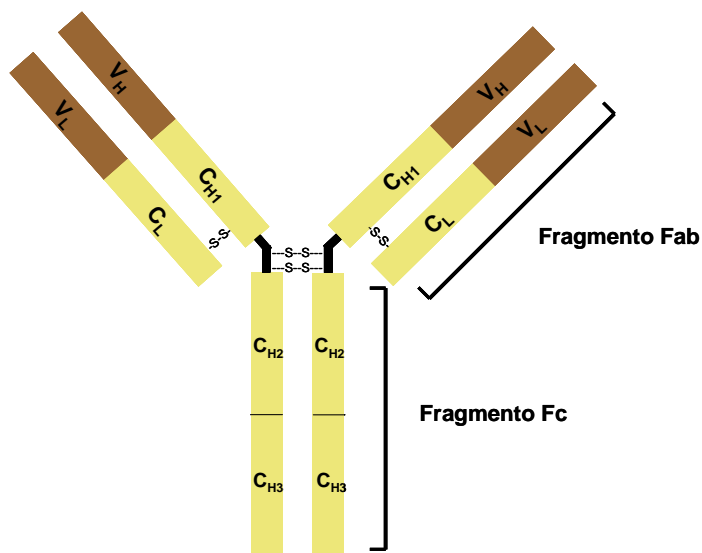
## 5.1 Introducción

La aplicación de métodos serológicos para la detección de presas es junto con la utilización de marcadores moleculares, la técnica post-mortem que puede proporcionar información más precisa y fácilmente interpretable de las relaciones establecidas entre un depredador y sus presas (Sheppard y Harwood 2005). Esta técnica utiliza anticuerpos de origen animal que van a reaccionar de manera específica contra antígenos de la presa diana. Como ya se comentó en el capítulo anterior, el uso de anticuerpos presenta una serie de ventajas respecto a otras técnicas de análisis post-mortem que la hacen muy recomendable en determinados tipo de estudios.

### 5.1.1 Estructura de los anticuerpos

Los anticuerpos o inmunoglobulinas son glicoproteínas que funcionan como la parte específica del sistema inmune de los vertebrados, reconociendo agentes externos al organismo (antígenos), y activando y ejecutando en última instancia la respuesta inmune frente a éstos. Este tipo de moléculas, sintetizadas por los linfocitos B, aparecen como receptores de membrana en éstos, y también son secretadas por las células plasmáticas procedentes de la activación, proliferación y diferenciación de estos linfocitos.

Estructuralmente están formados por dos cadenas polipeptídicas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) unidas entre si por puentes disulfuro (**Fig. 5.1**). Las cadenas ligeras constan de una región o dominio variable ( $V_L$ ) en la secuencia de amino terminales y de una región constante ( $C_L$ ). Las cadenas pesadas están formadas por una región o dominio variable ( $V_H$ ) y por tres constantes ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ). Desde un punto de vista funcional se pueden distinguir dos porciones: una implicada en el reconocimiento y unión al antígeno, región Fab (Fragment, antigen binding) y otra relacionada con los procesos de estabilidad de la molécula en el torrente sanguíneo, región Fc (Fragment, crystallizable).



**Figura 5.1** Estructura básica de una molécula de anticuerpo.

La región del antígeno reconocida por un anticuerpo es denominada determinante antigénico o epítipo. Esta región, en el caso de las proteínas, suele estar formada por no más de 15-22 aminoácidos (Goldsby et al. 2000) y es reconocida por el anticuerpo tanto por la secuencia peptídica de ésta como por su estructura conformacional.

Las regiones concretas con las que el anticuerpo reconoce al epítipo se denominan Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs) o Regiones Hipervariables. Existen seis Regiones Hipervariables, tres en el dominio variable de la cadena ligera V<sub>L</sub> y tres en el dominio variable de la cadena pesada V<sub>H</sub> (**Fig. 5.2**). Estas regiones son las responsables de la enorme especificidad y diversidad de los anticuerpos.



**Figura 5.2** Localización de las regiones hipervariables (CDRs) dentro del dominio variable (F<sub>v</sub>) de cada cadena. La variabilidad en secuencias de aminoácidos y longitud de estas regiones es la máxima responsable de la gran diversidad en afinidades de los anticuerpos.

## 5.1.2 Tipos de anticuerpos y su aplicación para los ensayos de detección de presas

### 5.1.2.1 Anticuerpos policlonales

En los vertebrados, la entrada de un antígeno estimula la producción de anticuerpos procedentes de diferentes clones de linfocitos B, frente a los múltiples epítomos distintos que éste presenta. A esta mezcla heterogénea de anticuerpos que componen el suero de un animal, se le conoce como suero policlonal o anticuerpos policlonales. Cuando se pretende obtener un suero que sea reactivo frente a un determinado tipo de antígeno, la sustancia frente a la cual se quiere conseguir las inmunoglobulinas es inyectada a un animal, generalmente un conejo, para provocar una respuesta inmune en éste. Una vez ésta ha ocurrido, el suero generado es extraído y posteriormente purificado. La aplicación de sueros policlonales en estudios de depredación mediante análisis post-mortem cuenta ya con más de 30 años de tradición (Boreham y Ohiagu, 1978, Miller 1981, Ragsdale et al. 1981). Los anticuerpos policlonales presentan las ventajas de ser baratos y rápidos de obtener. Por otro lado, suelen ser poco específicos, y además, cada suero obtenido de un animal es limitado e irrepetible (Symondson 2002, Sheppard y Harwood 2005). Debido a la relativa falta de especificidad de este tipo de sueros, cuando van a utilizarse en sistemas depredador-presa, éstos han de ser previamente probados con una gran variedad de presas alternativas para poder definir unos umbrales mínimos en los que la señal pueda considerarse aun como detección positiva (Sunderland 1988).

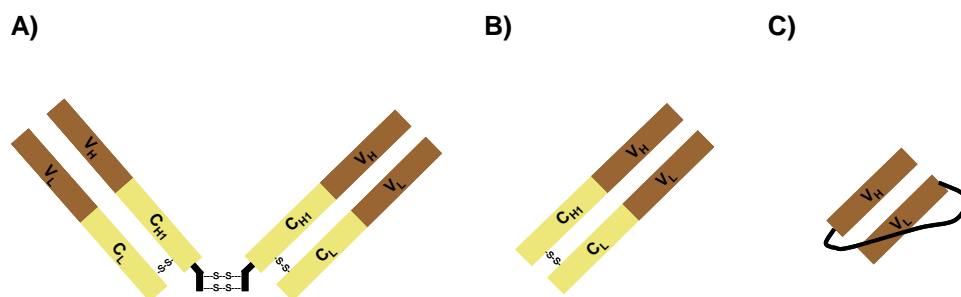
### 5.1.2.2 Anticuerpos monoclonales

Este tipo de anticuerpo procede de un único clon de linfocito B, de manera que son específicos para un solo epítipo. Köhler y Milstein (1975) desarrollaron la técnica de generación de hibridomas mediante la cual es posible conseguir poblaciones homogéneas de anticuerpos frente a un único antígeno. Para la obtención de este tipo de sueros, primero ha de ser inmunizado un animal con el antígeno de interés. Una vez realizada esta primera etapa, los distintos clones de linfocitos B productores de cada tipo de anticuerpo, son aislados y fusionados con células de mieloma, para que puedan ser perpetuados. Cada hibridoma sintetizará y segregará de manera indefinida un anticuerpo distinto. Los sueros obtenidos con cada línea de hibridomas se prueban frente al antígeno de interés y se seleccionan aquellos clones que presenten una mayor especificidad y sensibilidad. Los anticuerpos monoclonales obtenidos de esta manera pueden alcanzar grados de afinidad y especificidad no conseguidos por otros métodos (Greenstone 1996). De hecho, se han llegado a conseguir anticuerpos capaces de diferenciar entre distintos estadios larvarios (Greenstone y Morgan 1989). Por otro lado, la utilización de anticuerpos monoclonales que reconocen epítopos poco lábiles frente a los procesos de digestión o que sólo se muestran cuando el antígeno ya ha comenzado a ser digerido, ha permitido obtener tiempos de detección mucho más prolongados que los conseguidos por otras técnicas (Symondson et al. 2000, Harwood et al. 2001). El principal inconveniente de esta técnica es que el proceso de obtención de un anticuerpo monoclonal, es largo, laborioso, necesita de un equipo especializado y un personal experimentado, y además, tiene un componente estocástico muy elevado, de manera que no se puede garantizar en origen el éxito de un proyecto (Karu et al. 1995, Chen et al. 2000). Por otro lado, si todas estas dificultades son superadas, el hibridoma seleccionado va a generar una cantidad ilimitada de suero monoclonal que además podrá ser utilizado de manera rápida y barata en los protocolos de detección del antígeno (Symondson et al. 2002a).

### 5.1.2.3 Anticuerpos recombinantes de expresión en fagos (Phage display)

Esta técnica se basa en la inserción de una secuencia externa de ADN que codifica un fragmento funcional de anticuerpo, en el genoma de un bacteriófago de *Escherichia coli*. El fago al infectar a la bacteria utilizará sus funciones vitales para

completar su ciclo y replicarse (Winter et al. 1994). El inserto se encontrará fusionado con el gen de expresión de una proteína de cubierta, generalmente la pIII (gen III), de manera que los nuevos clones tendrán en la cubierta del fago, la partícula de anticuerpo codificada por el fragmento insertado. La secuencia de ADN insertada codificará las partes del anticuerpo implicadas en el reconocimiento del antígeno. Los fragmentos expresados podrán ser de distintas clases, Fab<sub>2</sub>, Fab y scFv, según los dominios que lo conformen (**Fig. 5.3**).



**Figura 5.3** Tipos de fragmentos de anticuerpos recombinantes obtenidos mediante la tecnología Phage display. **A)** Fragmentos (Fab)<sub>2</sub>, formados por todos los dominios variables del anticuerpo, los dominios constantes de las dos cadenas ligeras y los CH<sub>1</sub> de ambas cadenas pesadas. **B)** Fragmentos Fab, compuestos por 2 dominios variables y dos constantes. **C)** Fragmentos scFv (single-chain Fragment variable), fusión de dos regiones variables de las cadenas ligera y pesada mediante uniones de serina-glicinas.

En la actualidad para el empleo de esta tecnología se utilizan fagémidos, generalmente variantes del bacteriófago filamentosos M13, fd y f1 (Karu et al. 1995), que combinan las ventajas de los fagos y de los plásmidos. Estos vectores plasmídicos contienen el origen de replicación y señal de empaquetamiento del fago, y el origen de replicación y los sistemas de expresión génica del plásmido (**Fig. 5.4**). Los fagémidos pueden mantenerse como plásmidos en el interior de la bacteria dirigiendo la expresión de las proteínas deseadas, pero precisan de un fago ayudante (helper) para encapsularse. La utilización de fagémidos va a permitir enriquecer y seleccionar los clones que expresen los anticuerpos deseados, cuando éste se encuentre en forma de fago, y va a permitir también expresar fragmentos

solubles del anticuerpo (generalmente scFv), sin que sea necesario que esté encapsulado, cuando éste se encuentre en forma de plásmido en el interior de *E. coli*. Para poder producir estos fragmentos solubles, éstos deben aparecer libres de la proteína que expresa el gen III. Para ello, se ha introducido el codón de parada “ámbar” entre el gen III y la secuencia del scFv, de manera que detendrá la síntesis de la proteína pIII. Éste codón de parada, no es reconocido por cepas de *E. coli*, que como la cepa TG1, poseen una mutación supresora que impide reconocer a dicho codón. Cuando se quiera obtener fagos encapsulados, se utilizará esta cepa de *E. coli*, lo que permitirá la obtención de fagos que en su cubierta expresen el fragmento scFV fusionado a la proteína pIII. Para obtener los fragmentos solubles se utilizará la cepa no supresora *E. coli HB2151* (Hoogenboom et al. 1991).

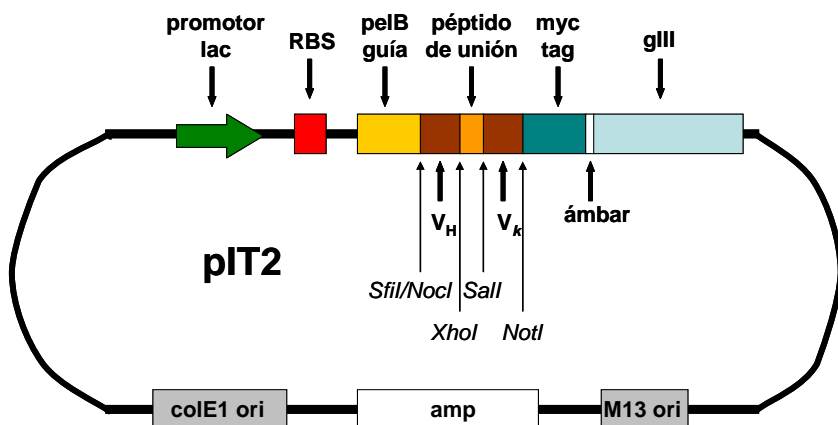
Actualmente existen colecciones formadas por una gran variedad de clones de fagos expresando cada uno una partícula de anticuerpo diferente. Estas colecciones de expresión o genotecas, generadas de manera artificial, a día de hoy ofrecen más diversidad (desde  $10^8$  hasta  $10^{10}$  clones) (Hoogenboom 2005) que la generada por un organismo superior (entre  $10^5$  y  $10^6$  clones de linfocitos B diferentes) (Harlow y Lane 1988). Esta mayor diversidad va a permitir una mayor probabilidad de éxito en los procesos de búsqueda de un clon específico y altamente sensible frente al antígeno de interés. Según los mecanismos utilizados para obtener la variabilidad en la secuencia genética insertada, las genotecas se pueden clasificar en los siguientes tipos (Hoogenboom 2005):

- *Genoteca Inmune*: los genes del inserto corresponden a genes de anticuerpos clonados de manera aleatoria a partir de una fuente de linfocitos B expuesta a un antígeno dentro del cuerpo de un organismo superior. Gracias a que el organismo generador de la genoteca ha estado expuesto al antígeno de interés, es más probable encontrar anticuerpos que cumplan las características deseadas.
- *Genoteca Naive*: Los genes del inserto corresponden a reordenaciones de los genes de las regiones variables (genes V) de anticuerpos, de linfocitos no expuestos al antígeno. Como el organismo de origen no ha estado condicionado por un proceso de inmunización específico, este tipo de genotecas serán más útiles para seleccionar anticuerpos frente a una gran variedad de antígenos.



- *Genoteca Sintética*: Este tipo de genotecas se construyen enteramente *in vitro* insertando oligonucleótidos en las regiones CDR de los genes V. La introducción de esta diversidad de tipo sintético permite sobrepasar las limitaciones propias de los procesos de generación de diversidad *in vivo*. Las secuencias insertadas son construidas artificialmente con oligonucleótidos sintéticos de las regiones variables de los anticuerpos.
- *Genoteca Semisintética*: Este tipo de genotecas busca variabilidad combinando los métodos sintéticos y naturales. Con ellas se busca incrementar la diversidad de origen natural pero intentando conservar cierta funcionalidad de ésta.

El proceso de selección de clones en una genoteca es mucho más rápido, barato, sencillo y eficaz que el utilizado en la selección de anticuerpos monoclonales clásicos. El fago seleccionado, como ocurre en el caso de los monoclonales clásicos, podrá ser usado de manera indefinida al ser replicado en *E. coli*. Por último, la utilización de este tipo de tecnología, libera del uso de animales, tan altamente cuestionado por la sociedad (Barbas et al. 1992, Hoogenboom y Winter 1992, Lerner et al. 1992).



**Figura 5.4** Mapa y características del vector plasmídico pIT2 utilizado en las genotecas de fagos recombinantes usadas en este trabajo. **Promotor lac**, promotor del sistema de selección de plásmidos a partir del metabolismo de la lactosa; **RBS**: sitio de unión del ribosoma para el inicio de la traducción; **pelB guía**: secuencia traducida de aa encargada de transportar la proteína a la que está unida a la membrana de *E. coli* para construir la cápsula del bacteriófago; **insertos V<sub>H</sub> y V<sub>K</sub>**: insertos recombinantes de las regiones variables de inmunoglobulinas de humanos; **péptido de unión**: secuencia peptídica que hace de unión entre ambos insertos; **myc tag**: secuencia de reconocimiento por anticuerpos, altamente inmuno-reactiva; **ámbar**: codon de parada en la traducción (UAG); **gIII**: gen de la proteína de cubierta pIII; **M13 ori**: origen de replicación del fago M13; **amp**: gen de resistencia a ampicilina; **colE1 ori**: origen de replicación del plásmido E1 de *E. coli*; y **SfiI/NcoI**, **XhoI**, **Sall**, **NotI**: enzimas de restricción que delimitan los insertos.

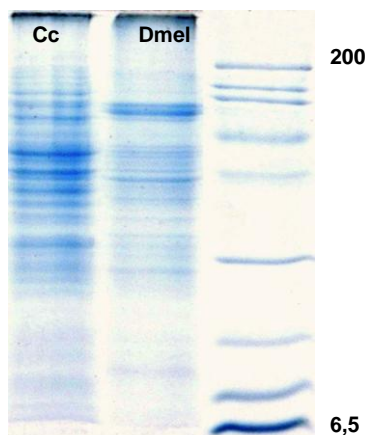
Tras haberse demostrado que existe una interacción real entre el complejo de depredadores polífagos que habita en los suelos de cítricos y la mosca mediterránea de la fruta, una de las líneas a seguir sería realizar una evaluación a gran escala de la acción que están ejerciendo a tiempo real el mayor número de especies que componen este complejo, para luego poder relacionarlo con los tipos de manejo del cultivo que afectan a estos depredadores, como pueda ser la utilización de cubiertas vegetales. El uso de anticuerpos monoclonales sigue siendo la opción más rápida y barata a la hora de realizar este tipo de estudios, donde se pretende analizar un número de elevado de muestras y un solo tipo de presa (Symondson 2002, Hagler y Naranjo 2005). Como ya se ha comentado, el principal problema que presenta esta técnica es el costoso proceso que supone la obtención del anticuerpo. Por esta

razón, en este último capítulo, se propone seleccionar un anticuerpo monoclonal específico frente a *C. capitata* a partir de una genoteca comercial de expresión en fagos. Esta aproximación, hasta la fecha no aplicada en estudios de análisis post-mortem, superaría todos los inconvenientes que conlleva la obtención de un anticuerpo monoclonal de origen animal. En paralelo, también se obtendrá un suero policlonal de conejo lo más específico posible frente a *C. capitata* que será comparado con los anticuerpos monoclonales recombinantes.

## 5.2 Material y métodos

### 5.2.1 Preparación de los extractos antigénicos

Debido a que no se tenía conocimiento de la existencia de ningún antígeno específico de *C. capitata* que pudiese ser utilizado de antemano en los protocolos de obtención y selección de anticuerpos, se usó un extracto general de proteína soluble de esta especie. Para ello se obtuvo una cantidad de adultos de mosca de la fruta, en proporción de sexos 1:1, con un peso fresco de 1 g. Esta masa de adultos fue machacada en frío sobre un volumen de 2 ml de tampón PBS (137 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl; pH 7,4). El extracto obtenido fue posteriormente centrifugado a 13.981 g, a 4°C durante 10 minutos y el sobrenadante rescatado, evitando arrastrar las grasas que quedaban en la superficie de éste. El volumen recogido se dividió en alícuotas de 100 µl. Las alícuotas de proteína soluble obtenidas se almacenaron a -20°C hasta su uso. La cantidad de proteína soluble presente en el extracto se valoró utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976). Tras la valoración, se realizó una electroforesis en gel de acrilamida al 12,5% de distintas diluciones del extracto (1:1, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100), para conocer el patrón de bandas de las proteínas que lo componían (**Fig. 5.5**).



**Figura 5.5** Patrón de bandas de los extractos de proteína soluble de *C. capitata* (Cc) y *D. melanogaster* (Dmel).

### 5.2.2 Obtención de anticuerpos policlonales

La obtención de anticuerpos policlonales específicos frente *C. capitata* se realizó mediante la inmunización de un conejo con el extracto antigénico previamente preparado. El animal, de raza *Nueva Zelanda*, fue proporcionado y mantenido por el Servicio de Animalario del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, CSIC, Madrid). Para conseguir la reacción inmune en el conejo, se programó un calendario de inyecciones. Éste consistió en una primera inoculación intradérmica en varios puntos de la espalda del animal, de un 1 ml de extracto de proteína soluble (500 µg/ml) emulsionada con 1 ml de Adyuvante Completo de Freund® (SIGMA-ALDRICH Steinheim am Albuch, Alemania), una segunda inyección intramuscular, dos semanas después, de una emulsión similar a la anterior pero utilizando Adyuvante Incompleto de Freund® (SIGMA-ALDRICH Steinheim am Albuch, Alemania), y una tercera inyección, intramuscular, 4 semanas después de la primera, de idéntica composición a la anterior. Una vez finalizado el proceso de inmunización se recogió una muestra de sangre del animal (5 ml) para comprobar si éste había sido efectivo (suero inmune). Previo al primer pinchazo, también se había realizado una sangría inicial para comprobar que el suero del animal no reaccionaba frente al antígeno utilizado (suero preinmune). Antes de su utilización en ensayos de inmunodetección, las muestras de sangre recogidas fueron incubadas a 37° C durante 30 minutos, dejadas posteriormente 15 horas a 4° C y centrifugadas durante 5 minutos a 3.000 g y 4° C de temperatura, para eliminar el coágulo sanguíneo. El sobrenadante fue rescatado e incubado a 56° C durante 30 minutos con la finalidad de inactivar el sistema del complemento, y de esta manera se obtuvo el suero purificado. La efectividad del proceso de inmunización se realizó ensayando mediante ELISA indirecto en placa, distintas concentraciones de los sueros inmune y preinmune (1:500, 1:1.000, 1:5.000 y 1:10.000) frente a distintas concentraciones del extracto de proteína soluble *C. capitata* (100, 10, 1 y 10<sup>-1</sup> µg/ml). La ausencia de reactividad del suero preinmune se comprobó mediante un análisis de varianza (ANOVA) que comparaba las medias de los valores de lectura de absorbancia del suero preinmune a las distintas concentraciones del extracto antigénico, y un control negativo (ausencia de antígeno y suero inmunológico). Una vez verificado el proceso de inmunización, se procedió a la extracción y purificación de todo el suero del animal. La sensibilidad y especificidad del suero inmune se evaluó enfrentando distintas diluciones de éste (1:500, 1:1.000, 1:5.000 y 1:10.000) a diferentes concentraciones

de extractos de proteína soluble de *C. capitata* y *D. melanogaster* (10, 1,  $10^{-1}$  y 0  $\mu\text{g/ml}$ ).

### 5.2.3 ELISA indirecto en placa

Esta metodología se aplicó en la detección de *C. capitata* utilizando anticuerpos policlonales de conejo y sueros monoclonales recombinantes.

Los pocillos de una placa de ELISA (Corning Constar®) de 96 pocillos se cubrieron con 100  $\mu\text{l}$  de una dilución en bicarbonato/carbonato coating buffer 100 mM (15 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 35 mM,  $\text{NaHCO}_3$ ; pH 9,6) del antígeno utilizado y se dejaron incubar durante 15 horas (over night, o/n) a 4° C. Transcurrido el periodo de incubación la solución del antígeno fue retirada volcando su contenido y lavando la placa tres veces con 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de una solución Tris-Tween20 (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, Tween 20® [SIGMA-ALDRICH] 0,1%). Los sitios libres se bloquearon añadiendo 200  $\mu\text{l}$ /pocillo de una solución PBS-leche desnatada en polvo 2% (MPBS 2%) e incubando 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la solución de bloqueo tres veces con 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de PBS y se añadió en cada pocillo 100  $\mu\text{l}$  de una dilución en suero de bloqueo (MPBS 2%) del anticuerpo primario. Ésta se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente y seguidamente se lavó 4 veces (100 $\mu\text{l}$ /pocillo) con tris-Tween20 (0,1%). Después de los lavados se añadió el anticuerpo secundario. En los ensayos con el suero policlonal de conejo se utilizó Horse Radish Peroxidase-conjugated anti Rabbit (HRP-ANTI-Rabbit, DAKO) en una dilución 1:1000. En los ensayos con anticuerpos de expresión en fagos se utilizó como anticuerpo secundario HRP-ANTI-m13 (Amersham) en una dilución 1:5000. El anticuerpo secundario se dejó incubar durante 1 hora y posteriormente fue eliminado mediante 4 lavados (100  $\mu\text{l}$ /pocillo) con Tris-Tween20 (0,1%). El sustrato utilizado para la reacción con la HRP fue preparado justo antes de su uso. Para ello, por cada placa de 96 pocillos, se disolvieron 4 tabletas de OPD (diclorhidrato de o-fenilendiamina, Dako) en 12 ml de tampón sustrato (ac. cítrico 35mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $2\text{H}_2\text{O}$ ) 67 mM) y se le añadió 5  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%). Se dispensaron 100  $\mu\text{l}$  de este sustrato por pocillo y se dejaron reaccionar 7 minutos en oscuridad. Una vez transcurrido ese tiempo, para detener la reacción colorimétrica se añadieron 100  $\mu\text{l}$ /pocillo de ac. sulfúrico 0,1 M. La intensidad de la reacción fue medida como valor de absorbancia en el lector de placas VERSAmax® (Molecular Devices, Sunnyvale, EEUU) a una longitud de onda de 492 nm.

## 5.2.4 Obtención de anticuerpos recombinantes

La obtención de anticuerpos recombinantes específicos frente a *C. capitata* se llevó a cabo utilizando las genotecas de fagos recombinantes Human Single Fold scFv I+J (Tomlison I+J) comercializadas por el Medical Research Council, HGMP Resource Centre (Cambridge, UK). Estas genotecas ('J' e 'I') son del tipo *naïve* y están construidas sobre estructuras de las regiones variables de las cadenas pesada ( $V_H$ ) y ligera ( $V_L$ ) de humanos, expresando fragmentos de anticuerpos tipo scFv. Ambas genotecas están construidas sobre el vector pIT2 y constan de  $1,47 \times 10^8$  clones diferentes, con un 96% de porcentaje de inserto, para la genoteca Tomlison I, y  $1,37 \times 10^8$  clones diferentes, con un porcentaje de inserto del 88%, para la genoteca Tomlison J.

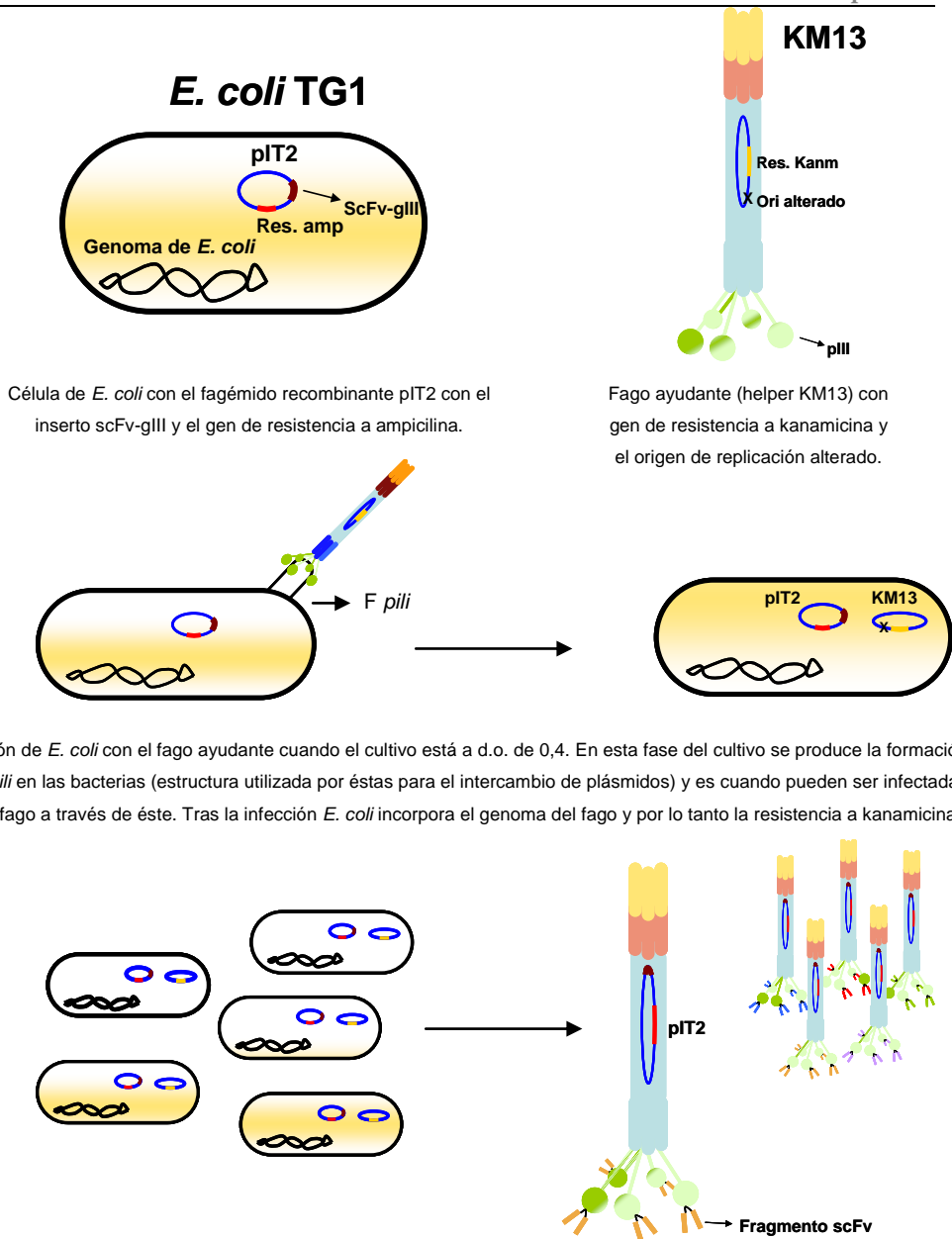
### 5.2.4.1 Propagación de la genoteca

Las genotecas I y J se utilizaron en todo momento en paralelo para asegurarse la selección del mayor número de clones posibles capaces de unirse al antígeno diana.

El stock de cada genoteca, que se encontraba en forma de plásmido (pIT2) en el interior de células de *E. coli* TG1 (**Fig. 5.6**), fue añadido a 200 ml de medio de cultivo bacteriano 2xTY (Bacto<sup>®</sup>-triptona 16 g, Bacto<sup>®</sup>-extracto de levadura 10 g, NaCl 5 g, H<sub>2</sub>O hasta 1 l), con 100 µg/ml de ampicilina y 1% de glucosa, para promover el crecimiento de aquellas células que contuviesen en su interior el plásmido. El cultivo bacteriano se dejó crecer en un agitador a 37° C hasta alcanzar una densidad óptica (d.o.) a 600 nm de 0,4 (1-2 horas), fase de crecimiento celular óptima para la infección con fagos. Una vez alcanzado el momento óptimo de infección, se recogieron 50 ml del cultivo y se les añadió  $2 \times 10^{11}$  unidades del fago ayudante KM13 (Los 150 ml restantes se utilizaron para obtener un stock secundario de las genotecas [apartado 5.2.4.2]). Para que la infección se hiciese efectiva, se dejó incubar el cultivo en un baño sin agitación a 37° C durante 30 min. El fago ayudante, tiene un gen de resistencia al antibiótico kanamicina que permite seleccionar aquellas células en las que la infección ha sido efectiva, y un origen de replicación alterado de manera que el empaquetamiento del fagémido es más eficiente que el del ayudante (Hoogenboom et al. 1998). Tras el proceso de infección el cultivo fue centrifugado a 3.000 g durante 10 minutos y el precipitado bacteriano resuspendido en 100 ml de 2xTY con 100 µg/ml de ampicilina, 50 µg/ml de kanamicina y 0,1% de

glucosa. Este nuevo cultivo se dejó o/n en agitación a 30° C para promover el crecimiento selectivo de aquellas células de *E. coli* que contuviesen el plásmido del fagémido, con resistencia a ampicilina, y el ADN del ayudante, con resistencia a kanamicina, y para inducir la posterior multiplicación y encapsulado del fagémido. Transcurrido el periodo o/n el cultivo fue centrifugado a 3.300 g durante 30 minutos a 4° C con la finalidad de eliminar todas las células por precipitación. Una vez rescatado el sobrenadante (aprox. 80 ml), donde se encontraba la suspensión de nuevos fagos, éste se mezcló en proporción 5:1 con una solución de PEG/NaCl (Polyetilen glycol 6000® 100 g, NaCl 73,06 g, H<sub>2</sub>O 500 ml) y se dejó 1 h en hielo para facilitar el posterior precipitado de los fagos. Transcurrida la hora, la solución se centrifugó a 3.300 g, 4° C, durante 30 minutos, se eliminó completamente el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 4 ml de PBS. La nueva suspensión se centrifugó 10 minutos a 11.600 g y 4° C para eliminar posibles restos de bacteria, se recogió el sobrenadante y se almacenó en alícuotas a 4° C si iban a ser utilizadas en breve, o a -70° C con 15% glicerol, si se pretendía conservar durante periodos largos de tiempo. La titulación de los fagos de la genoteca propagada se realizó mediante diluciones seriadas de éstos, añadiendo 100 µl de cada dilución a 900 ml de un cultivo de TG1 a d.o. de 0,4 e incubando a 37° C durante 30 minutos para inducir la infección de las bacterias. De cada dilución incubada con TG1 se recogieron 10 µl y se añadieron a una placa con medio sólido de cultivo TYE (Bacto®-triptona 10 g, Bacto®-extracto de levadura 5 g, NaCl 8 g, Bacto®-agar 15 g H<sub>2</sub>O hasta 1 l) con 100 µg/ml de ampicilina y 1% de glucosa, y se dejó crecer a 37° C o/n, de manera que así sólo se favoreció el crecimiento de aquellas colonias que habían incorporado el plásmido.





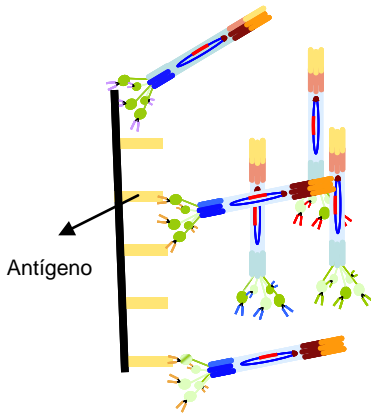
**Figura 5.6** Proceso de propagación de una genoteca de anticuerpos recombinantes y obtención de fagos que expresan el anticuerpo (fagemización de la genoteca).

### 5.2.4.2 Obtención de un stock secundario de las genotecas

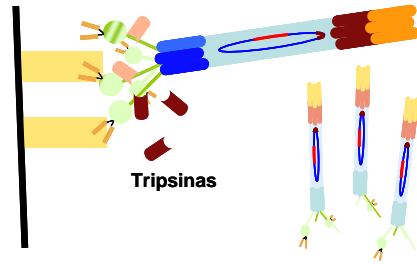
Los 150 ml de cultivo no utilizados en el protocolo anterior tras la primera fase de crecimiento celular de las genotecas originales, se dejaron crecer 2 horas más en el agitador a 37° C, se precipitaron posteriormente las células a 10.800 g durante 10 minutos, y se resuspendió el precipitado en 10 ml de 2xTY con un 15% de glicerol. De cada genoteca se hicieron 20 alícuotas de 500 µl que se almacenaron a -70° C para ser utilizadas en futuros ensayos de selección con fagos frente a otros antígenos.

### 5.2.4.3 Enriquecimiento y selección de clones (biopanning)

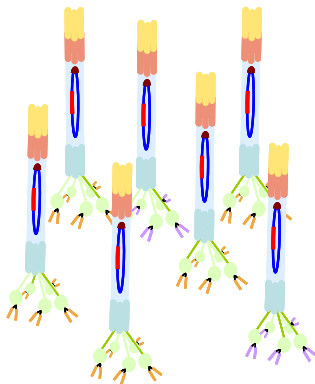
El proceso de selección y enriquecimiento de clones con capacidad de unión específica a los antígenos del extracto de proteína soluble de *C. capitata* (**Fig. 5.7**), se realizó en placas de ELISA. Con cada genoteca se utilizaron 16 pocillos de una placa. Cada pocillo se cubrió con 50 µl de una dilución en coating buffer (10mM, pH 9,6) del extracto de proteína soluble a una concentración de 10 µg/ml. En la misma placa, también se cubrieron 8 pocillos por genoteca con 50 µl de MPBS 3%, que sirvieron como controles negativos en el proceso de biopanning, al no existir fagos en estas genotecas con capacidad de unión específica a este sustrato. La placa se dejó incubar o/n para que la proteína soluble se adhiriera a las paredes del pocillo. Transcurrido este tiempo, la solución fue retirada y los pocillos lavados tres veces con 100 µl de PBS. Para bloquear los sitios libres restantes de las paredes de los pocillos, se añadió a cada uno 200 µl de MPBS 3% y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente se vaciaron y lavaron tres veces con 100 µl/pocillo de PBS. Finalizada la etapa de fijación del antígeno y bloqueo de sitios libres, de cada genoteca fagemizada se añadieron 10<sup>12</sup> unidades de fago diluidas en MPBS 3% a razón de 50 µl/pocillo. La placa se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente. Después del periodo de incubación en el que algunos de los clones se habrían unido específicamente a los antígenos fijados, el contenido de los pocillos fue eliminado y éstos se lavaron 20 veces con 200 µl/pocillo de PBS-Tween20 0,1% y 3 veces más con 200 µl/pocillo de PBS. Después de haberse eliminado con los lavados los fagos no unidos específicamente a los antígenos, para eluir los fagos que sí se habían unido al antígeno, se añadió a cada pocillo 50 µl de una solución de tripsina (T-1426 Tipo XIII de páncreas de bovino, Sigma) en PBS (1 mg/ml) y se dejó



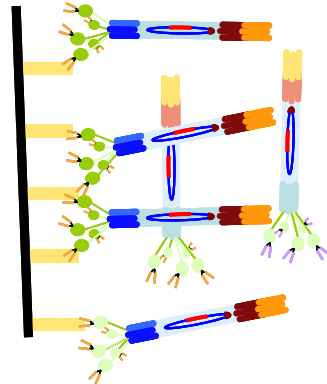
Selección de clones de fagos que expresan fragmentos scFv específicos frente al antígeno de interés, en placas ELISA. El antígeno estará adherido a la pared de la placa.



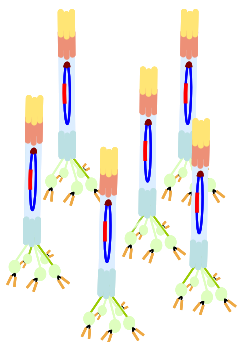
Elución de los fagos que se unieron específicamente al antígeno mediante tripsinas. Estos enzimas degradan las proteínas de cubierta del fago rompiendo así los enlaces con el antígeno.



Enriquecimiento de los fagos seleccionados infectando TG1 siguiendo un protocolo similar al de la propagación de la genoteca.



Segunda ronda de selección con los fagos enriquecidos de la primera ronda. La proporción de fagos afines al antígeno se ha incrementado.



Repetición de la fase de selección y enriquecimiento al menos una vez más, hasta obtener uno o unos pocos clones distintos específicos frente al antígeno utilizado.

**Figura 5.7** Proceso de selección y propagación de fagos (biopanning).

incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Tras haber separado con este paso el fago del antígeno, se recogió la solución ( $\approx 800 \mu\text{l}$  por genoteca), se almacenaron  $400 \mu\text{l}$  en la nevera y se utilizaron los otros  $400 \mu\text{l}$  para infectar  $2,8 \text{ ml}$  de cultivo de TG1 en 2xTY a una densidad óptica de 0,4. Se dejó 30 minutos a  $37^\circ \text{C}$  para que la infección se hiciese efectiva, y posteriormente se centrifugó a  $11.600 \text{ g}$ ,  $4^\circ \text{C}$  durante 5 minutos. El precipitado obtenido se resuspendió en  $1 \text{ ml}$  de 2xTY y se plaqueó en una placa petri de  $15 \text{ cm}$  con medio sólido TYE,  $100 \mu\text{g/ml}$  de ampicilina y 1% de glucosa para promover el crecimiento selectivo de aquellas colonias que hubiesen incorporado el plásmido pIT2. Cada colonia obtenida procedía de un único clon de anticuerpo recombinante seleccionado en favor del antígeno utilizado, siendo por lo tanto el conjunto de colonias de una placa el equivalente a un suero policlonal.

Tras una sola ronda de biopanning, el número de clones recogidos que no son específicos frente al antígeno utilizado es aún muy elevado, por lo que se recomienda realizar al menos 2 rondas más siguiendo el mismo protocolo descrito, y utilizando los fagos eluidos de la ronda anterior. En el ensayo realizado, las colonias plaqueadas al final de la ronda previa, fueron fagemizadas infectando un cultivo procedente de éstas con  $5 \times 10^{10}$  unidades de helper y siguiendo un protocolo similar al explicado para la propagación y fagemización de la genoteca. A partir de la segunda ronda de selección, como ya sólo se trabajaba con un número de clones diferentes relativamente pequeño ( $< 1000$  aprox.), se utilizaron concentraciones de fago de  $5 \times 10^{11} \text{ pfu/ml}$ . Como en cada ronda de selección se recogen los fagos unidos específicamente y luego se enriquecen, después de una ronda de biopanning, el número de fagos eluidos, deberá incrementarse de manera exponencial al haber más proporción de fagos afines al antígeno. Cuando el título obtenido después de una ronda de biopanning con el antígeno seleccionado es mucho más elevado que el de los controles (más de un orden de magnitud) se considera que se ha realizado una selección efectiva frente al antígeno.

#### **5.2.4.4 Selección de clones. Evaluación de su especificidad y sensibilidad**

Tras realizar 3 rondas de biopanning, se aislaron 80 colonias independientes del eluido de cada genoteca. Para la obtención de sueros monoclonales de fagos expresando los fragmentos scFcv, cada colonia se inoculó en  $3 \text{ ml}$  de medio líquido 2xTY con  $100 \mu\text{g/ml}$  de ampicilina y 1% de glucosa y se dejó crecer o/n a  $37^\circ \text{C}$  en

agitación. Al día siguiente se transfirieron 60  $\mu$ l de inóculo de cada tubo a uno nuevo con 6 ml de medio 2xTY con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 1% de glucosa y se dejó crecer en agitación a 37° C hasta alcanzar una d.o. de 0,4. En ese momento se le añadió a cada tubo 750  $\mu$ l de 2xTY con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina, 1% de glucosa y 1,5 x10<sup>10</sup> unidades helper y se dejó incubar a 37° C sin agitación durante 1 hora. Tras la fase de infección se centrifugaron los tubos a 3.300 g, 4° C durante 10 minutos y el precipitado se resuspendió en 6 ml de 2xTY con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 50  $\mu$ g/ml de kanamicina, dejándolo crecer en agitación a 30° C o/n para favorecer el crecimiento selectivo de aquellas bacterias con el plásmido pIT2 y el helper KM13, y la posterior propagación y encapsulamiento del fagémido recombinante. Tras el crecimiento o/n, los tubos se centrifugaron a 3.300 g 4 °C durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante ( $\approx$  5,5 ml/tubo) siendo separado en alícuotas de 2 ml. El suero obtenido de cada tubo correspondía a un suero de anticuerpo monoclonal recombinante.

Los sueros de los distintos clones de las dos genotecas fueron ensayados mediante ELISA indirecto, según el protocolo explicado anteriormente, frente a distintas concentraciones de nuestro antígeno (10  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml y 0,1  $\mu$ g/ml) para evaluar su sensibilidad, y frente extractos de proteína soluble de *Drosophila melanogaster*, *P. cribata* y *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera: Noctuidae), para poder realizar una primera evaluación de su especificidad.

Los resultados obtenidos con los distintos clones fueron comparados con los obtenidos con el suero policlonal de conejo.

#### **5.2.4.5 Secuenciación, alineamiento y comparación de las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>K</sub> de los clones seleccionados**

Los clones que dieron mejores resultados fueron secuenciados y comparados en las regiones de los insertos V<sub>H</sub> y V<sub>K</sub> con la finalidad de comprobar si se trataban de los mismos insertos en cada caso, o por el contrario cada clon, y por lo tanto cada anticuerpo, era diferente.

La extracción del plásmido se realizó mediante el protocolo de extracción directa de plásmidos de alto número de copias, ofrecido por SECUGEN® (Madrid, España) (SECUGEN 2008). La secuenciación se realizó utilizando el servicio de secuenciación que ofrece esta empresa.

Los cromatogramas obtenidos se revisaron y ensamblaron utilizando el paquete de programas Staden Package (Staden Package 2003). Las secuencias consenso de cada colon se extrajeron en formato fasta para su alineamiento posterior.

El alineamiento y comparación de secuencias se llevó a cabo utilizando la aplicación informática GeneDoc (Nicholas et al. 1997) empleando el algoritmo MSA implementado en el software con un Blossom 62, un coste constante de longitud de 20, un coste de apertura de gap 8 y un coste de extensión de gap 4. Para comprobar que los fragmentos secuenciados pertenecían a las regiones  $V_H$  y  $V_k$ , las secuencias obtenidas fueron comparadas contra la base de datos GENE BANK utilizando la aplicación BLASTN 2.2.21 (Altschul et al. 1990, Altschul et al. 1997).

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Anticuerpos policlonales de conejo

Tras el proceso de inmunización, desangrado del conejo y purificación del suero policlonal se obtuvo un volumen final de 45 ml. Al comparar las lecturas de absorbancia a 492 nm del suero preinmune con extractos de proteína soluble de *C. capitata* ( $0,045 \pm 0,001$ ), y el control negativo (ausencia de antígeno y suero inmunológico) ( $0,044 \pm 0,001$ ) no se observaron diferencias significativas entre ambos ( $F = -1,28$ ;  $gl = 1, 29$ ;  $P = 0,2672$ ). En cambio, con el suero inmune se pudo detectar la presencia de proteína soluble de *C. capitata* en un rango de concentraciones entre 10 y 0,1  $\mu\text{g/ml}$  (**Tabla 5.1**). El suero mostró reactividad frente al antígeno en diluciones de éste de hasta 1:10.000. Con ninguna de las diluciones utilizadas se obtuvo señal sin presencia de extracto antigénico (0  $\mu\text{g/ml}$ ). Con las diluciones del suero 1:5.000 y 1:10.000 a penas se podía detectar concentraciones de proteína soluble de *C. capitata* de 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , siendo los valores de la lectura de absorbancia similares a los obtenidos con los controles negativos.

Dilución suero	10 $\mu\text{g/ml}$		1 $\mu\text{g/ml}$		0,1 $\mu\text{g/ml}$		0 $\mu\text{g/ml}$
	Cc	Dmel	Cc	Dmel	Cc	Dmel	
1:500	1,267 $\pm 0,065$	0,537 $\pm 0,062$	0,755 $\pm 0,061$	0,375 $\pm 0,020$	0,149 $\pm 0,013$	0,071 $\pm 0,015$	0,044
1:1000	1,180 $\pm 0,042$	0,481 $\pm 0,090$	0,662 $\pm 0,050$	0,335 $\pm 0,050$	0,122 $\pm 0,015$	0,079 $\pm 0,006$	0,046
1:5.000	0,783 $\pm 056$	***	0,409 $\pm 058$	***	0,067 $\pm 0,004$	***	0,045
1:10.000	0,595 $\pm 0,017$	0,188 $\pm 0,003$	0,241 $\pm 0,006$	0,117 $\pm 0,005$	0,058 $\pm 0,006$	0,052 $\pm 0,003$	0,046

**Tabla 5.1** Lecturas de absorbancia a 492 nm (promedio  $\pm$  error estándar) obtenidas mediante ELISA indirecto al enfrentar diferentes diluciones del suero policlonal de conejo con distintas concentraciones de extractos de proteína soluble de *C. capitata* (Cc) y *D. melanogaster* (Dmel).

(\*\*\*) La dilución del suero 1:5.000 no fue ensayada con *D. melanogaster*.

Al comparar las lecturas de absorbancia del suero policlonal frente a extractos de proteína soluble de *C. capitata* y *D. melanogaster* a igual concentración, se observó que la señal obtenida era entre 2 y 3 veces más intensa con *C. capitata* que con *D.*

*melanogaster*, dependiendo de las concentraciones del antígeno y del anticuerpo primario (**Tabla 5.1**). Las mayores diferencias se observaron cuando el suero policlonal estaba más diluido (1:10.000) y cuando se detectaban concentraciones más altas del extracto antigénico de 10 µg/ml.

## **5.3.2 Anticuerpos monoclonales recombinantes**

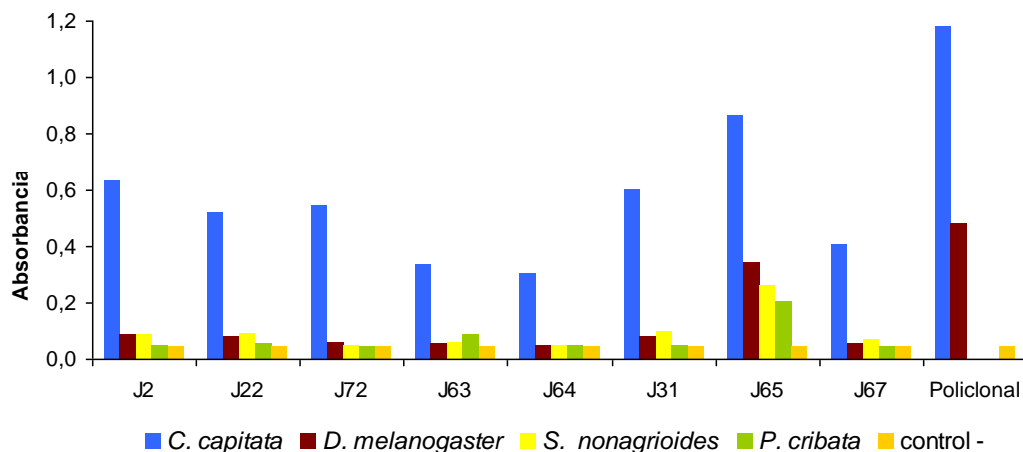
### **5.3.2.1 Selección de clones**

De los 160 clones obtenidos y ensayados mediante ELISA indirecto, se seleccionaron los clones de la genoteca Tomlison J: J2, J22, J31, J63, J64, J65, J67 y J72 por presentar unos valores de sensibilidad y especificidad que podrían permitir su uso en ensayos de detección de presas. Por el contrario, no se seleccionó ningún clon de la genoteca Tomlison I. Los clones seleccionados mostraron una elevada especificidad frente al antígeno de *C. capitata* al compararlo con las lecturas de absorbancia obtenidas con *D. melanogaster*, *P. cribata* y *S. nonagrioides*. De hecho, con alguno de estos clones se obtuvo una señal hasta 7 veces más intensa con el extracto de proteína soluble de *C. capitata* que con el de *D. melanogaster* y la lectura de absorbancia fue similar a la del control negativo con los extractos de *P. cribata* y *S. nonagrioides* (**Fig. 5.8**).

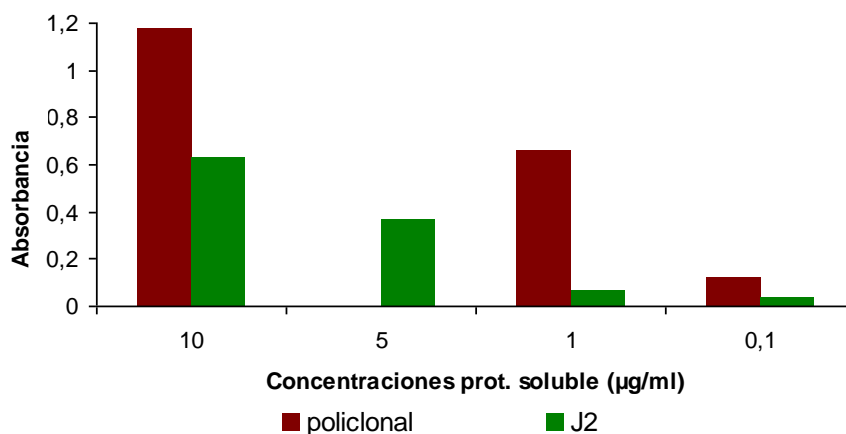
Los sueros de anticuerpos monoclonales seleccionados fueron capaces de detectar concentraciones de proteína soluble entre 10 y 5 µg/ml. A concentraciones menores la señal decaía rápidamente (**Fig. 5.9**).

Los sueros monoclonales de anticuerpos expresados en fagos se mostraron menos sensibles que el suero policlonal de conejo (**Fig. 5.8**). En cambio, éstos fueron mucho más específicos que el suero policlonal (**Fig. 5.9**).





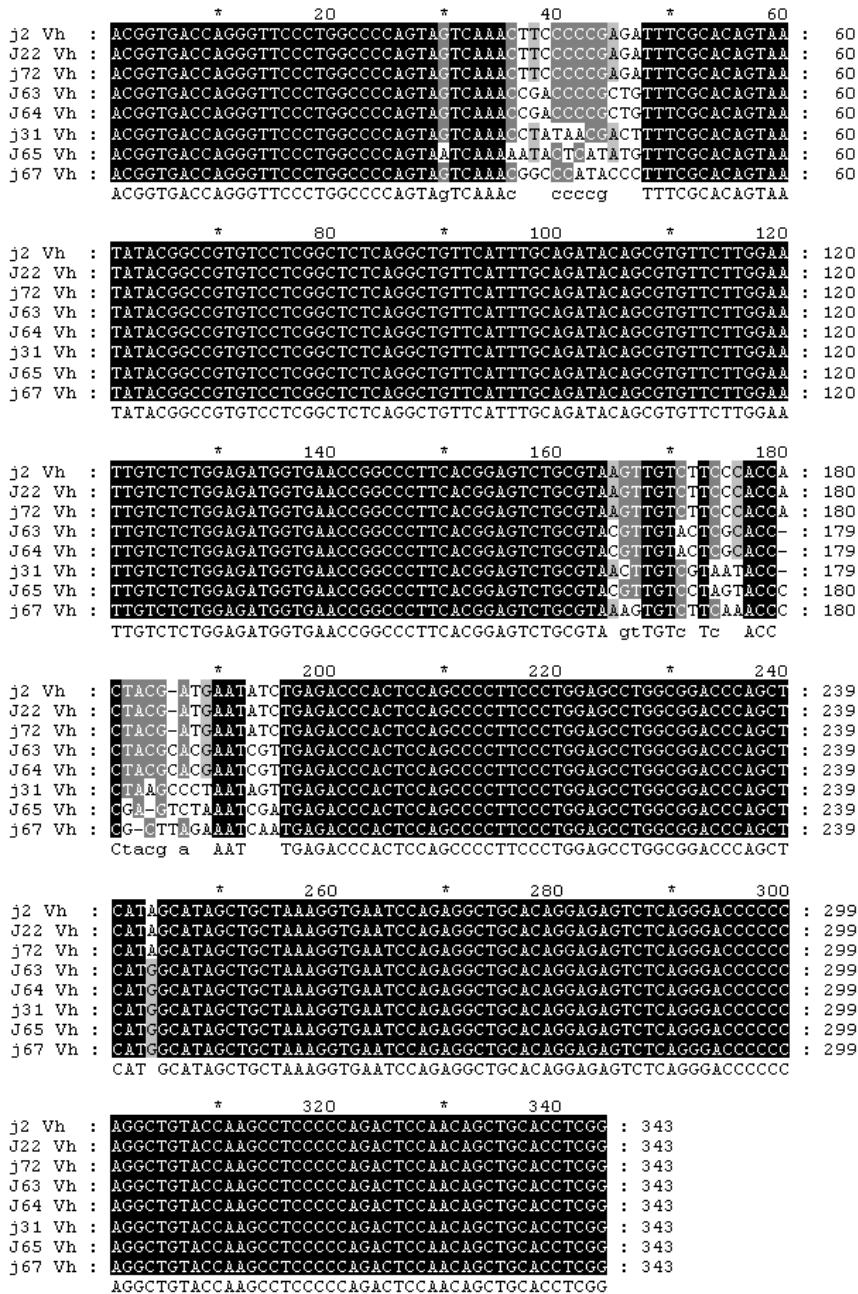
**Figura 5.8** Lecturas de absorbancia a 492 nm de los distintos sueros monoclonales de anticuerpos recombinantes seleccionados, al enfrentarlos a extractos de proteína soluble (10 µg/ml) de 4 especies de artrópodos de importancia agrícola (*C. capitata*, *D. melanogaster*, *S. nonagrioides* y *P. cribata*) y un control negativo; y del suero policlonal de conejo (dilución 1:1000) con extractos de proteína soluble (10 µg/ml) de *C. capitata* y *D. melanogaster*.



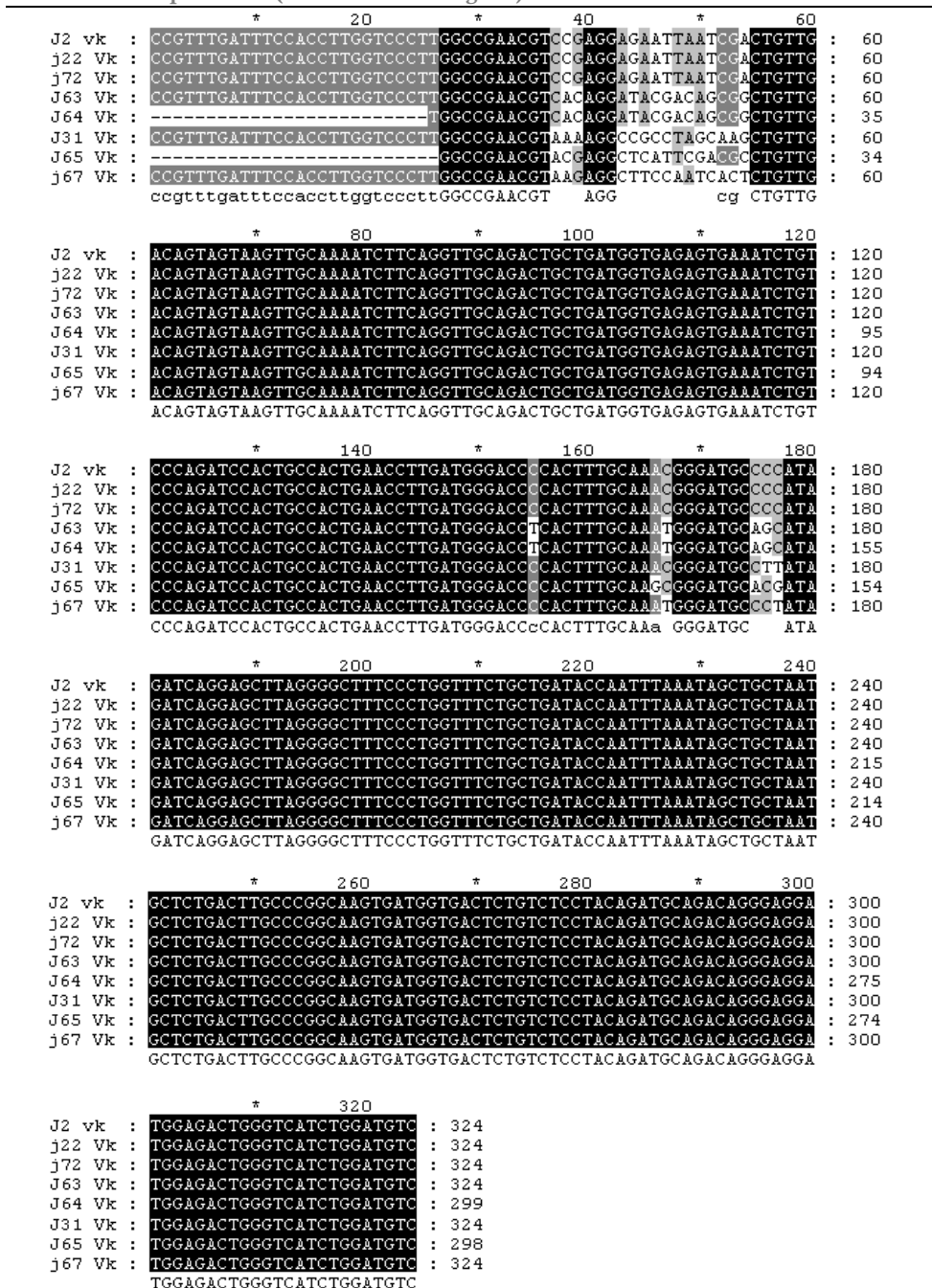
**Figura 5.9** Lecturas de absorbancia a 492 nm del suero policlonal de conejo (dilución 1:1.000) y del clon J2, al enfrentarlos a distintas concentraciones de proteína soluble de *C. capitata* (10, 1, 0,1 µg/ml para el suero policlonal, y 10, 5, 1, 0,1 µg/ml para el suero monoclonal).

### 5.3.2.2 Secuenciación, alineamiento y comparación de las regiones $V_H$ y $V_k$ de los clones seleccionados

Al comparar las secuencias de las regiones  $V_H$  y  $V_k$  de los 8 clones seleccionados se comprobó que los sueros J2, J22 y J72 pertenecían a un mismo clon de la genoteca, J63 y J64 provenían de otro clon, y J31, J65 y J67 eran clones distintos (**Fig. 5.10** y **Fig. 5.11**). Las diferencias entre clones se dieron en las secuencias de ambas regiones. La variabilidad encontrada fue debida a unos pocos nucleótidos. En las secuencias del fragmento  $V_H$ , esta se concentró principalmente en tres regiones de entre 10 y 15 nucleótidos, probablemente correspondiéndose a las 3 regiones hipervariables del  $V_H$ . El fragmento  $V_k$  concentró la variabilidad principalmente en una región de 19 nucleótidos y una segunda región de 24 nucleótidos en la que existían diferencias en unas pocas bases. Al comparar nuestras secuencias con otras existentes en la base de datos GenBank, la mayor identidad encontrada con nuestras secuencias  $V_k$  fue observada con la del precursor HK102 de la región V-1 que codifica la cadena variable *kappa* ( $V_k$ ) de inmunoglobulinas de *H. sapiens* (Identidad: 92%, Gaps: 2/271, Expected: 3e-107). Las secuencias que codificaban la cadena  $V_H$  fueron muy similares al locus LOC100291190 de *H. sapiens* que codifica la región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina (Identidad: 89%, Gaps: 9/295, Expected: 3e-98).



**Figura 5.10** Alineamiento de las secuencias del inserto V<sub>H</sub> de los clones seleccionados. Color negro indica que no existen diferencias. Grises más claros indican más diferencias entre los nucleótidos de una misma posición de los distintos clones.



**Figura 5.11** Alineamiento de las secuencias del inserto  $V_k$  de los clones seleccionados. Color negro indica que no existen diferencias. Los 25 y 26 primeros nucleótidos de los clones J64 y J65 no aparecen por errores de secuenciación en el inicio de las secuencias.

## 5.4 Discusión

Se han obtenido anticuerpos reactivos frente a *C. capitata* mediante dos aproximaciones diferentes. Una clásica, generación de anticuerpos policlonales de conejo, y otra más innovadora, utilización de genotecas de anticuerpos recombinantes.

El suero de anticuerpos policlonales seleccionado presentó unos valores de sensibilidad suficientes para su uso en ensayos de detección de presas pero en cambio, se mostró poco específico. En general los sueros policlonales son propensos a presentar una elevada reactividad cruzada (Symondson 2002) ya que éstos contienen todos los anticuerpos previos a la inmunización del animal y además, normalmente se obtienen utilizando extractos antigénicos con multitud de epítomos diferentes, siendo muchos de ellos no específicos de la especie que se pretende detectar. Si se quiere utilizar el suero policlonal desarrollado en la detección de *C. capitata* en condiciones de campo, sería conveniente mejorar su especificidad. Esto puede realizarse mediante técnicas de absorción y precipitación, o utilizando columnas de afinidad (Symondson y Liddell 1993, Schoof et al. 1986).

Según nuestro conocimiento, este trabajo es el primero que selecciona y secuencía anticuerpos recombinantes para ser utilizados en un estudio de análisis post-mortem. La especificidad de alguno de los clones seleccionados parece estar al nivel de otros anticuerpos monoclonales clásicos (Symondson et al. 2000, Thomas et al. 2009), ya que las lecturas de absorbancia obtenidas frente a extractos de *D. melanogaster*, especie filogenéticamente cercana a la mosca mediterránea de la fruta, de *P. cribrata* y de *S. nonagroides*, fueron mucho más bajas que las obtenidas con *C. capitata*. Estos resultados tan solo pueden ser considerados como preeliminares. El estudio de reactividad cruzada deberá completarse con otras especies de artrópodos potenciales presas de los depredadores de *C. capitata*, para así determinar unos umbrales mínimos de detección a partir de los cuales la lectura de absorbancia pueda considerarse con seguridad como positiva (Sunderland 1988).

Todos los sueros seleccionados de anticuerpos recombinantes expresados en fagos mostraron unos niveles de sensibilidad menores que los obtenidos con anticuerpos clásicos (Buchholz et al. 1994, Lim y Lee 1999, Harwood et al. 2001). Este resultado probablemente se deba a que los ensayos de inmunodetección se han realizado utilizando sueros en los que los anticuerpos (fragmentos scFv) se expresan

fusionados a la cubierta del fago. El tamaño del complejo anticuerpos-fago (aproximadamente 900 nm) es unas 120 veces mayor que el de un anticuerpo clásico (160 kDa y 7,5 nm aproximadamente [Ban et al. 1994, Cann 2005]). El elevado tamaño del complejo podría dificultar y hacer más improbable la unión al antígeno, con la consiguiente pérdida de sensibilidad. Este problema debería ser superado al utilizar un suero de fragmentos solubles scFv, producidos por *E. coli* HB2151 que hayan incorporado los plásmidos pIT2 de los fagos seleccionados. Los fragmentos scFv, con un tamaño aproximado de 26 kDa, son el dominio de anticuerpos funcional más pequeño existente (Malecki 2002). Es de esperar que la sensibilidad de los sueros monoclonales sea mayor si se trabaja con fragmentos solubles scFv en vez de con fragmentos scFv fusionados a la cubierta del fago. De hecho, los sueros de anticuerpos recombinantes son reconocidos por su alta sensibilidad; de hecho, la obtención de sueros de afinidad picomolar es una de las aplicaciones más exitosas del uso de este tipo de genotecas (Hoogenboom 2005).

Los resultados obtenidos en la selección de anticuerpos recombinantes son resultados preliminares que deberán ser completados para conocer si alguno de los clones seleccionados puede ser aplicado eficientemente en estudios de detección de presa. Además de la evaluación de los parámetros de sensibilidad y especificidad, también ha de determinarse la vida media del epítipo que detectamos en el interior del tracto digestivo de los depredadores (Sheppard y Harwood 2005), donde se encuentra sometido a los procesos degradativos de los enzimas digestivos. Mediante estos tres parámetros se podrán establecer los tiempos máximos de detección post-digestión de los sueros seleccionados.

Una vez puestos a punto los protocolos y familiarizados con el uso de genotecas recombinantes, la selección de un anticuerpo recombinante específico frente a un antígeno puede realizarse en menos de dos semanas, lo que supone superar el principal inconveniente que conlleva las técnicas de selección de anticuerpos monoclonales clásicos, en los que el proceso de obtención de una línea de hibridomas suele durar en el mejor de los casos unos 6 meses (Greenstone 1996). Además, al contrario de lo que ocurre con las técnicas de generación de hibridomas, no se necesita de una gran especialización ni en personal ni en equipamiento para manejar este tipo de genotecas.

Con la aparición de nuevas genotecas de variabilidad en clones mucho mayor a la variabilidad en anticuerpos ofrecida por un mamífero de manera natural, o incluso, con la posibilidad de generar genotecas seleccionadas frente a un antígeno de interés (Karu et al. 1995, Hoogenboom 2005), el campo de los anticuerpos recombinantes se nos abre como una alternativa al uso de anticuerpos monoclonales clásicos e incluso marcadores moleculares, en los estudios de análisis post-mortem, ya que es capaz de combinar muchas de las ventajas que presentan ambas técnicas.

La obtención de un suero monoclonal específico frente a *C. capitata* permitirá estudiar a gran escala de manera rápida y barata, las interacciones entre el complejo de depredadores generalistas presentes en los suelos de cítricos de la región en estudio y esta plaga. Un conocimiento más exhaustivo de estas interacciones ayudará a incorporar su uso de una manera más eficiente en los programas de gestión integrada de *C. capitata*.





## 6 Conclusiones

De los resultados expuestos en el presente estudio se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1) Se ha encontrado una gran riqueza y abundancia (actividad-densidad) de artrópodos depredadores polífagos presentes en el suelo del agroecosistema cítricos en el mediterráneo español.

- Las arañas con 51 especies y 20 familias constituyeron el grupo de depredadores con mayor diversidad, siendo el licósido *Pardosa cribata* la especie más abundante. El grupo de estafilínidos fue el segundo en riqueza de especies, siendo *Atheta mucronata*, nueva cita en la Península Ibérica, la más abundante. El carábido *Pseudophonus rufipes* representó más del 50% del total de carábidos. El dermáptero *Forficula auricularia* fue la especie más abundante de este grupo en todas las parcelas.
- Se ha encontrado una influencia del tipo de manejo de la cubierta vegetal en la abundancia de estos depredadores. En las parcelas donde existía una cubierta vegetal, espontánea o cultivada, se obtuvo una mayor abundancia de depredadores.
- El complejo de depredadores se mostró activo a lo largo de todo el año por la combinación de los diferentes patrones de actividad estacional de las distintas especies que lo conforman. El licósido *P. cribata* fue la especie más activa en primavera, ocupando este lugar el carábido *P. rufipes* en verano y otoño, y el dermáptero *F. auricularia* en los meses más fríos.

2) Se ha establecido, en condiciones de laboratorio, que los tres depredadores prevalentes: *P. cribata*, *P. rufipes* y *F. auricularia* pueden utilizar como presa alguno de los tres estados de desarrollo de *C. capitata*, que pueden coincidir temporal y espacialmente con ellos en los suelos de cítricos.

- El licósido *P. cribata* se mostró más eficaz frente adultos, el carábido *P. rufipes* frente a pupas y larvas de 3º estadío, y *F. auricularia* frente a la larvas de 3º estadío de manera que las tres especies se complementarían en su acción como agentes de control de esta plaga.
  - Los tres depredadores mostraron una respuesta funcional tipo II. *Pseudophonus rufipes* fue la especie más eficaz, mientras que *F. auricularia* fue la que mostró parámetros de depredación más bajos.
  - *Pardosa cribata* fue capaz de matar más adultos de *C. capitata* de los que luego consumió. Este comportamiento propio de muchas arañas (sobreeplotación), se considera beneficiosa desde el punto de vista del control biológico.
- 3)** Se han diseñado dos marcadores moleculares específicos de *C. capitata* con los que es posible detectar la presencia de su ADN, mediante PCR, en el tracto digestivo de *P. cribata* y *P. rufipes*, las dos especies que mostraron mayor eficiencia depredadora en condiciones de laboratorio.
- Los largos tiempos de detección 50 obtenidos en laboratorio para ambos depredadores y la especificidad demostrada de los dos pares de cebadores diseñados validan su aplicación en condiciones de campo.
  - Se ha comprobado que, en condiciones de campo, tanto *P. cribata* como *P. rufipes* utilizan como presa *C. capitata*, aunque el porcentaje de individuos que dieron positivo fue menor en *P. cribata* (5%) que en *P. rufipes* (23%). Esto supone una contribución original y de gran utilidad para futuros trabajos de campo que pretendan evaluar la depredación sobre este fitófago.
- 4)** Se han desarrollado anticuerpos específicos frente a *C. capitata*, para disponer de una herramienta adicional a las técnicas moleculares, lo que permitirá abordar la

evaluación, a gran escala, de la actividad depredadora del complejo de depredadores generalistas en cítricos.

- Se ha obtenido un anticuerpo policlonal de conejo que presenta una elevada sensibilidad pero baja especificidad.
- Por primera vez se han seleccionado varios anticuerpos recombinantes monoclonales altamente específicos frente a *C. capitata*. Tanto la sensibilidad como la especificidad de estos anticuerpos deberá evaluarse más exhaustivamente para así poder determinar su aplicabilidad en ensayos de detección de presas.

Finalmente, cabe subrayar que las herramientas moleculares e inmunológicas desarrolladas en este trabajo abren nuevas posibilidades a futuros estudios encaminados a conocer la acción no sólo de los depredadores polífagos presentes en el suelo de los cítricos sino también a los presentes en la parte aérea.



## 7 Bibliografía

**Aguilar-Fenollosa, E., Pascual-Ruiz, S., Hurtado-Ruiz, M. y Jacas, J-A.** 2009. The effect of ground cover management on the biological control of *Tetranychus urticae* (Acari: Prostigmata) in clementines, pp 354-365. *En* Mason, P.G., Gillespie, D.R. y Vincent, C. (eds). Proceedings del ISBCA 3.

**Agustí, N, de Vicente, M.C. y Gabarra, R.** 1999a. Immunological detection of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) ingested by heteropteran predators: time-related decay and effect of meal size on detection period. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92: 56-62.

**Agustí, N., De Vicente, M.C. y Gabarra, R.** 1999b. Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction-based technique for predator gut analysis. *Mol. Ecol.* 8: 1467-1474.

**Agustí, N., De Vicente, M.C. y Gabarra, R.** 2000. Developing SCAR markers to study predation on *Trialeurodes vaporariorum*. *Insect Mol. Biol.* 9: 263-268.

**Agustí, N., Shayler, S.P., Harwood, J.D., Vaughan, I.P., Sunderland, K.D. y Symondson W.O.C.** 2003a. Collembola as alternative prey sustaining spiders in arable ecosystems: prey detection within predators using molecular markers. *Mol. Ecol.* 12: 3467-3475.

**Agustí, N., Unruh, T.R. y Welter, S.C.** 2003b. Detecting *Cacopsylla pyricola* (Hemiptera : Psyllidae) in predator guts using COI mitochondrial markers. *Bull. Entomol. Res.* 93: 179-185.

**Albajes, R. y Santiago-Álvarez, C.** 1980. Efectos de la densidad larvaria y de la alimentación en la proporción de sexos de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *An. INIA, Ser. Agrí.* 13: 175-182.

**Allen, R.T.** 1979. The occurrence and importance of ground beetles in agricultural and surrounding habitats, pp 485-505. *En* Halpern, A.L. (ed). *Carabid Beetles: Their evolution, natural history and classification*. The Hauge-Boston-London: Junk Publishers. 646pp.

**Allen, W.R. y Hagley, A.C.** 1990. Epigeal Arthropods as Predators of Mature Larvae and Pupae of the Apple Maggot (Diptera: Tephritidae). *Environ. Entomol.* 19: 309-312.

- Alonso, M., Del Rio, M.A. y Jacas, J-A.** 2005. Carbon dioxide diminishes cold tolerance of third instar larvae of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) in 'Fortune' mandarins: implications for citrus quarantine treatments. *Postharvest. Biol. Tec.* 36: 103-111.
- Altieri, M.A. y Schmidt, L.L.** 1986. Cover crops affect insect and spider populations in apple orchards. *Calif. Agric.* 40: 15-17.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J.** 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.  
PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2231712>
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.  
PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254694>  
PMC <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=146917>
- Aluja, M.** 1993. Manejo integrado de la mosca de la fruta. Trillas. México D.F, México. 251pp.
- Alvis, L.** 2003. Identificación y abundancia de artrópodos depredadores en los cultivos de cítricos Valencianos. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Andersen, A. y Eltun, R.** 2000. Long-term developments in the carabid and staphylinid (Col. Carabidae and Staphylinidae) fauna during conversion from conventional to biological farming. *J. Appl. Ent.* 124: 51-56.
- Argilés, R. y Tejedo, V.** 2007. La lucha contra la mosca de la fruta mediante la técnica del insecto estéril en la Comunidad Valenciana. Monografía *Ceratitis capitata*. Levante agrícola 385: 157-162.
- Asante, S.K.** 1995. Functional Responses of the European Earwig and Two Species of Coccinellids to Densities of *Eriosoma lanigerum* (Hausmann) (Hemiptera: Aphididae). *Aust. J. Entomol.* 34: 105-109.
- Aussel, J-P. y Linley, J.R.** 1994. Natural food and feeding behavior of *Culicoides furens* larvae (Diptera: Ceratopogonidae). *J. Med. Entomol.* 31: 99-104.

- Ban, N., Escobar, C., García, R., Hasel, K., Day, J., Greenwood, A. y McPherson, A.** 1994. Crystal structure of the idiotype-anti-idiotype Fab complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 1604-1608.
- Barbas, C.F., Kang, A.S., Lerner, R.A. y Benkovic, S.J.** 1992. Semisynthetic combinatorial antibody libraries: A chemical solution to the diversity problem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4457-4461.
- Barbosa, P.** 1998. Conservation biological control. Academic Press. San Diego, EEUU. 396pp.
- Beebe, T.J.C. y Rowe, G.** 2004. An Introduction to Molecular Ecology. Oxford University Press. New York, EEUU. 372 pp.
- Beitia, F.** 1998. Orden Dermoptera, pp 381-386. *En* De Liñán, C. (ed). Entomología Agroforestal. Agrotécnica. Madrid, España.
- Beitia, F., Pérez-Hinarejos, M., Santiago, S., Garzón, E., Tarazona, I. y Falcó, J.V.** 2007. Control biológico con parasitoides. Monografía *Ceratitis capitata*. Levante Agrícola 385: 145-150.
- Benfatto, D. y di Franco, F.** 2002. Citrus spiders: ground-dwelling species. *L'informatore Agrario* 58: 57-61.
- Bilde, T. y Toft, S.** 1998. Quantifying food limitation of arthropod predators in the field. *Oecologia* 115: 54-58.
- Bodenheimer, F.S.** 1951. Citrus entomology in the Middle East. Junk, W. (ed). The Hague, The Netherlands. 663pp.
- Boreham, P.F.L y Ohiagu, C.E.** 1978. The use of serology in evaluating invertebrate prey-predator relationships: a review. *Bull. Entomol. Res.* 68: 171-194.
- Borre, J.V., Bonte, D. y Maelfait, J-P.** 2006. Interdemic variation of cannibalism in a wolf spider (*Pardosa minticola*) inhabiting different habitat types. *Ecol. Entomol.* 31: 99-105.
- Bower, C.C.** 1992. Control of European earwig, *Forficula auricularia* L. in stonefruit orchards at Young, New South Wales. *Gen. Appl. Entomol.* 24: 11-18.
- Bradford M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

- Buchholz, U., Schmidt, S. y Schruft, G.** 1994. The use of an immunological technique in order to evaluate the predation on *Eupoecilia ambiguella* (Hbn.) (Lepidoptera: Cochylidae) in Vineyards. *Biochem. Syst. Ecol.* 22: 671-677.
- Bunge, J. y Fitzpatrick, M.** 1993. Estimating the number of species: a review. *J. Amer. Statistical Assoc.* 88: 364-373.
- Burnip, G.M., Daly, J.M., Hackett, J.K. y Suckling, D.M.** 2002. European earwig phenology and effect of understorey management on population estimation. *New Zeland Plant Protection* 55: 390-395.
- Burns, R.E., Harris, D.L., Moreno, D.S. y Eger, J.E.** 2001. Efficacy of spinosad bait sprays to control Mediterranean and Caribbean fruit flies (Diptera: Tephritidae) in commercial citrus in Florida. *Fla. Entomol.* 84: 672-678.
- Buxton, J.H. y Madge, D.S.** 1976. The evaluation of the European earwig, *Forficula auricularia* L. as a predator of the damson-hop aphid (*Phorodon humili*). I. Feeding experiments. *Entomol. Exp. Appl.* 19: 109-114.
- Caballero, U., León-Cortés, J.L. y Morón-Ríos, A.** 2009. Response of rove beetles (Staphylinidae) to various habitat types and change in Southern Mexico. *J. Insect. Conserv.* 13: 67-75.
- Calvitti, M., Antonelli, M., Moretti, R. y Bautista, R. C.** 2002. Oviposition response and development of the egg-pupal parasitoid *Fopius arisanus* on *Bactrocera oleae*, a tephritid fruit fly pest of olive in the Mediterranean basin. *Entomol. Exp. Appl.* 102: 65-73.
- Camara, M., Borgemeister, C., Markham, R.H. y Poehling, H-M.** 2003. Electrophoresis analysis of the prey spectrum of *Teretrius nigrescens* (Lewis) (Col., Histeridae), a predator of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Col., Bostrichidae), in Mexico, Honduras and Benin. *J. Appl. Entomol.* 127: 360-368.
- Cann, A.J.** 2005. Principles of molecular virology. Elsevier Academic Press. 315pp.
- Carroll, D.P., Waker, J.T.S. y Hoyt, S.C.** 1984. Augmentation of European earwigs (Dermaptera: Forficulidae) for biological control of apple aphid (Homoptera: Aphididae) in an apple orchard. *J. Econ. Entomol.* 77: 738-740.
- Carroll, D.P., Walker, J.T.S. y Hoyt, S.C.** 1985. European earwigs (Dermaptera: Forficulidae) fail to control apple aphids on bearing apple trees and woolly apple aphids (Homoptera: Aphididae) in apple rootstock stool beds. *J. Econ. Entomol.* 78: 972-974.



- Casaña-Giner, V., Gandía-Balaguer, A., Mengod-Puerta, Primo-Millo, J. y Primo-Yufera, E.** 1999. Insect growth regulators as chemosterilants for *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 92: 303-308.
- Castañera, P.** 2003a. Control integrado de la mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) en cítricos. Proyecto RTA03-103-C6.
- Castañera, P.** 2003b. Control integrado de la mosca mediterránea de la fruta, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) en cítricos. Phytoma España. 153: 131-133.
- Castañera, P.** 2007. La Unidad Asociada de Entomología IVIA-CIB y su papel en el control de *Ceratitis capitata*. Monografía *Ceratitis capitata*. Levante Agrícola 385: 89-90.
- Chao, A., Ma, M.C. y Yang, M.C.K.** 1993. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. Biometrika 80: 193-201.
- Chen, Y., Giles, K.L., Payton, M.E. y Greenstone, M.H.** 2000. Identifying key cereal aphid predators by molecular gut analysis. Mol. Ecol. 9: 1887-1898.
- Cherry, T., Szalanski, A.L., Todd, T.C. y Powers, T.O.** 1997. The internal transcribed spacer region of *Belonolaimus* (Nemata: Belonolaimidae). J. Nematol. 29: 23-29.
- Christenson, L. y Foote, R.** 1960. Biology of fruit fly. Ann. Rev. Entomol. 5: 171-192.
- Chueca, P.** 2007. Mecanización de métodos de control de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) en cítricos. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Chueca, P., Montón, H., Ripollés, J.L., Castañera, P., Moltó, E. y Urbaneja, A.** 2007. Spinosad bait treatments as alternative to malathion to control the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in the Mediterranean Basin. J. Pest Sci. 32: 407-411.
- Clough, Y., Kruess, A., Kleijn, D. y Tscharnkte, T.** 2007. Spider diversity in cereal fields: comparing factors at local, landscape and regional scales. J. Biogeogr. 32: 2007-2014.
- Coaker, T.A. y Williams, A.** 1963. The importance of some Carabidae and Staphylinidae as predators of the cabbage root fly *Kerioishia brassicae* (Bouche). Entomol. Exp. Appl. 6: 156-164.
- Coddington, J.A. y Levi, H.W.** 1991. Systematics and evolution of spiders. Annu. Rev. Ecol. Syst. 22: 565-592.

- Colwell, R.K. y Coddington, J.A.** 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philos. T. Roy. Soc. B.* 345: 101-118.
- Craig, R.** 1960. The physiology of excretion in insect. *Ann. Rev. Entomol.* 5: 53-68.
- Davies, N., Villablanca, F.X. y Roderick, G.K.** 1999. Bioinvasions of the medfly *Ceratitis capitata*: source estimation using DNA sequences at multiple intron loci. *Genetics* 153: 351-360.
- de León, J.H., Fournier, V., Hagler, J.R. y Daane, K.M.** 2006. Development of molecular diagnostic markers for sharpshooters *Homalodisca coagulata* and *Homalodisca liturata* for use in predator gut content examinations. *Entomol. Exp. Appl.* 119: 109-119.
- Debouzie, D.** 1989. Biotic mortality factors in tephritid populations, pp 221-227. *En* Robinson, A.S. y Hooper, G. (eds). *World Crop Pest*, Vol. 3B, Fruit flies. Elsevier, New York. EEUU.
- Del Pino, A.A.** 2000. Efecto de factores abióticos y edáficos naturales en el ciclo biológico de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- den Boer, P.J. y den Boer-Daanje, W.** 1990. On life-history tactics in carabid beetles: are there only spring and autumn breeders?, pp. 247-258. *En* Stork, N.E. (ed). *The Role of Ground Beetles in Ecological and Environmental Studies*. Intercept, Andover, Hampshire. London, UK. 424 pp.
- Dennis, P., Wratten, S.D., Sotherton, N.W.** 1990. Feeding behaviour of the staphylinid beetle *Thachyporus hypnorum* in relation to its potential for reducing aphid numbers in wheat. *Ann. Appl. Biol.* 117: 267-276.
- Dennison D.F. y Hodkinson I.D.** 1983. Structure of the predatory beetle community in a woodland soil ecosystem. 1. Prey selection. *Pedobiologia* 25: 109-115.
- Desender, K., Dufrene, M. y Maelfait, J-P.** 1994. Long term dynamics of carabid beetles in Belgium: a preliminary analysis on the influence of changing climate and land use by means of a database covering more than a century, pp 247-252. *En* Desender, K. (ed). *Carabid Beetles: Ecology and Evolution*. Kluwer Academic Publishers. Dordrechts, The Netherlands. 492 pp.

- Dodd, C.S., Fleming, C.C. y Murchie, A.K.** 2003. Detection of *Ropalosiphum insertum* (apple-grass aphid) predation by the predatory mite *Anystis baccarum* using molecular gut analysis. *Agric. For. Entomol.* 5: 219-225.
- Drew, R., Courtice, A. y Teakle, D.** 1983. Bacteria as a natural source of food for adult fruit flies. *Oecologia* 60: 279-284.
- Duelli, P., Obrist, M.K. y Schmatz, D.R.** 1999. Biodiversity evaluation in agricultural landscapes: above-ground insects. *Agr. Ecosyst. & Env.* 74: 033-064.
- Ehrlich, H.A.** 1989. PCR technology: principles and applications for DNA amplification. New York, Stockton Press.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).** 2006.  
[http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Ceratitis\\_capitata/CERTCA\\_map.htm](http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Ceratitis_capitata/CERTCA_map.htm)
- Eskafi, F.M. y Kolbe, M.** 1990. Predation on Larval and Pupal *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) by the Ant *Solenopsis geminata* (Hymenoptera: Formicidae) and Other Predators in Guatemala. *Environ. Entomol.* 19: 148-153.
- Escudero-Colomar, L.A., Vilajeliu, M., Peñarrubia, E. y Batllori, L.** 2009. Estudios comparativos de la capacidad de captura de difusores de atrayentes, modelos de mosqueros y diversos insecticidas para *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Comunicación oral. IV Congreso Nacional de Entomología Aplicada. Palma de Mallorca 19-23 de Octubre.
- EstimateS.** 2006. Free package software, version 8th ed.  
<http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>
- FAO.** 2006. Frutos Cítricos Frescos y Elaborados. Estadísticas anuales 2006. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación.  
<http://www.fao.org/es/esc/common/ecg/243/en/bull2006.pdf>. Acceso 12 julio de 2009.
- Farinós, G.P., de la Poza, M., Hernández-Crespo, P., Ortego, F. y Castañera, P.** 2008. Diversity and seasonal phenology of aboveground arthropods in conventional and transgenic maize crops in Central Spain. *Biol. Control* 44: 362-371.
- Fibla, J.M., Martínez-Ferrer, M.T., Campos, J.M., Monfort, R. y Colell, R.** 2007. Control de *Ceratitis capitata* Wied. en variedades tempranas de cítricos y pequeñas superficies, mediante diferentes estrategias de trampeo masivo. Monografía *Ceratitis capitata*. Levante Agrícola 385: 126-134.

- Fimiani, P.** 1989. Mediterranean region, pp 37-55. *En* Robinson, A.S. y Hooper, G.H. (eds). Fruit flies: Their biology, natural enemies and Control, Vol. 3. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 448 pp.
- Finch, S. y Elliot, M.S.** 1994. Predation of cabbage root fly eggs by carabidae. IOBC/WPRS Bull. 17: 167-195.
- Flessel, P., Quintana, P.J.E. y Hooper, K.** 1993. Genetic toxicity of malathion: a review. Environ. Mol. Mutagen. 22: 7-17.
- Fletcher, J.** 1989. Movements of Tephritidae fruit flies, pp 209-217. *En* Robinson, A.S. y Hooper, G.H. (eds). Fruit flies: Their biology, natural enemies and Control, Vol. 3. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 448 pp.
- Foltan, P., Sheppard, S., Konvicka, M. y Symondson, W.O.C.** 2005. The significance of facultative scavenging in generalist predator nutrition: detecting decayed prey in the guts of predators using PCR. Mol. Ecol. 14: 4147-4158.
- Forbes, S.A.** 1883. The food relations of the Carabidae and Coccinellidae. Bulletin of the Illinois State Laboratory of Natural History. 1: 33-64.
- Frank, S.D., Wratten, S.D., Sandhu, H.S. y Shrewsbury, P.M.** 2007. Video analysis to determine how habitat strata affects predator diversity and predation of *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae) in a vineyard. Biol. Control. 41: 230-236.
- Frank, T. y Nentwig, W.** 1995. Ground dwelling spiders (Araneae) in sown weed strips and adjacent fields. Acta Oecol. 16: 179-193.
- Galli, J.C. y Rampazzo, E.F.** 1996. Enemigos naturales predadores de *Anastrepha* (Diptera, Tephritidae) capturados con trampas de gravedad de suelo en huertos de *Psidium guajava* L. Bol. San. Veg. Plagas 22: 297-300.
- Glück, E. y Ingrisch, S.** 1990. The effect of bio-dynamic and conventional agriculture management on Erigoninae and Lycosidae spiders. J. Appl. Entomol 1990. 110: 136-148.
- Goldsby, R.A., Kindt, T.J. y Osborne, B.A.** 2000. Kuby Immunology. Folchetti, N., Tannenbaum, J. y Hadler, G. L. (eds.) W. H. Freeman and Company. New York, EEUU. 670pp.
- Gómez-Clemente, F.** 1932. Un ensayo de lucha biológica contra la *Ceratitis capitata* en Valencia. Bol. Pat. Veg. y Ent. Agr. 6: 80-89.

- Gómez-Clemente, F.** 1934. Los parásitos de la *Ceratitis capitata* Wied. Nuevos ensayos de importación y aclimatación. Bol. Pat. Veg. y Ent. Agr. 7: 69-80.
- Gómez-Clemente, F.** 1948. Experiencias sobre el empleo de DDT contra "mosca de las frutas" (*Ceratitis capitata*). Bol. Pat. Veg. y Ent. Agr. 16: 253.
- Górski, R., Sobieralski, K. y Siwulski, M.** 2006. Application of the predatory beetle *Atheta coriaria* Kraatz (Coleoptera, Staphylinidae) in biological control of mushroom sciarids (Sciaridae) in the cultivation of mushroom (*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach). Progr. Plant Protect. 46: 319-321.
- Green, J.** 1999. Sampling method and the time determines composition of spider collections. J. Arachnol. 27: 176-182.
- Greenstone, M.H.** 1995. Bollworm or budworm? Squashblot immunoassay distinguishes eggs of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens*. J. Econ. Entomol. 88: 213-218.
- Greenstone, M.H.** 1996. Serological analysis of arthropod predation: past, present and future, pp. 265-300. En Symondson, W. O. C. y Liddell, J. E. (eds.). The ecology of Agricultural Pests: Biochemical Approaches. Chapman & Hall. Londres, UK. 532pp.
- Greenstone, M.H.** 2006. Molecular methods for assessing insect parasitism. Bull. Entomol. Res. 96: 1-13.
- Greenstone, M.H. y Bennett, A.F.** 1980. Foraging strategy and metabolic rate in spiders. Ecology. 61: 1255-1259.
- Greenstone, M.H. y Hunt, J.H.** 1993. Determination of prey antigen half-life in *Polistes metricus* using a monoclonal antibody-based immunodot assay. Entomol. Exp. Appl. 68: 1-7.
- Greenstone, M.H. y Morgan, C.E.** 1989. Predation on *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae): an instar specific ELISA for stomach analysis. Ann. Entomol. Soc. Am. 82: 45-49.
- Greenstone, M.H., Rowley, D.L., Weber, D.C., Payton, M.E. y Hawthorne, D.J.** 2007. Feeding mode and prey detectability half-lives in molecular gut-content analysis: an example with two predators of the Colorado potato beetle. Bull. Entomol. Res. 97: 201-209.

**Gurr, G.M. y Kvedaras, O.L.** 2009. Synergizing biological control: Scope for sterile insect technique, induced plant defences and cultural techniques to enhance natural enemy impact. *Biol. Control. In press*.

**GV.** 2005. Generalitat Valenciana. *Bulletí d'Avisos*, Juny 2005. 87: 17-20.

**Hackett, B.J. Gimmig, J. y Guelbeogo, W.** 2000. Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS2) sequences differentiate *Anopheles funestus* and *An. rivulorum*, and uncover a cryptic taxon. *Insect Mol. Biol.* 4: 2059-2067.

**Hagen, K.S., Wiliam, W.W. y Tassan, R.L.** 1981. Mediterranean fruit fly: The worst may be yet come. *California Agric.* 35: 5-7.

**Hagler, J.R. y Naranjo, S.E.** 1997. Measuring the sensitivity of prey remains in relation to predator species, temperature, time, and meal size. *Biol. Control.* 9: 112-119.

**Hagler, J.R. y Naranjo, S.E.** 2005. Use of a gut content ELISA to detect whitefly predator feeding activity alter field exposure to different insecticide treatments. *Biocontrol Sci. Techn.* 15: 321-339.

**Hagler, J.R., Naranjo, S.E., Bradley-Dunlop, D., Enriquez, F.J. y Henneberry, T.J.** 1994. A monoclonal antibody to pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) egg antigen: a tool for predator gut analysis. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 85-90.

**Halsall, N.B. y Wratten, S.D.** 1988. The efficiency of pitfall trapping for polyphagous predatory Carabidae. *Ecol. Entomol.* 13: 293-299.

**Hamann, H.J. y Iwannek, K.H.** 1981. The use of the indicador activation method for the labelling of tsetse flies. *Zeitschrift für angewandte Entomologie* 91: 206-212.

**Harlow, E. y Lane, D.** 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. New York, EEUU. 726pp.

**Harper, G.L., King, R.A., Dodd, C.S., Harwood, J.D., Glen, D.M., Bruford, M.W. y Symondson W.O.C.** 2005. Rapid screening of invertebrate predators for multiple prey DNA targets. *Mol. Ecol.* 14: 819-827.

**Hartke, A., Drummond, F.A., Liebman, M.** 1998. Seed Feeding, Seed Caching, and Burrowing Behaviors of *Harpalus rufipes* De Geer Larvae (Coleoptera: Carabidae) in the Maine Potato Agroecosystem. *Biol. Control* 13: 91-100.

- Harwood, J.D., Phillips, S.W., Sunderland, K.D. y Symondson, W.O.C.** 2001. Secondary predation: quantification of food chain errors in an aphid-spider-carabid system using monoclonal antibodies. *Mol. Ecol.* 10: 2049-2057.
- Harwood, J.D., Sunderland, K.D. y Symondson, W.O.C.** 2005. Monoclonal antibodies reveal the potential of the tetragnathid spider *Pachygnatha degeeri* (Araneae: Tetragnathidae) as an aphid predator. *Bull. Entomol. Res.* 95: 161-167.
- Hassell, M.P.** 1978. *The Dynamics of Arthropod Predator-prey Systems*. Princeton University Press. Princeton. EEUU. 237pp.
- Hassell, M.P. y May, R.M.** 1986. Generalist and Specialist Natural Enemies in Insect Predator-Prey Interactions. *J. Anim. Ecol.* 55: 923-940.
- Hassell, M.P., Lawton, J.H. y Beddington, J.R.** 1977. Sigmoid functional responses by invertebrate predators and parasitoids. *J. Anim. Ecol.* 46: 249-262.
- Hawkes, R.B.** 1972. A fluorescent dye technique for marking insect eggs in predation studies. *J. Econ. Entomol.* 65: 1477-1478.
- He, X.Z., Wang, Q. y Xu, J.** 2008. European earwig as a potential biological control agent of apple leaf-curling midge. *New Zealand Plant Protection.* 61: 343-349.
- Hendrichs, J., Robinson, A.S., Cayol, J.P. y Enkerlin, W.** 2002. Medfly area wide sterile insect technique programmes for prevention suppression or eradication: The importance of mating behaviour studies. *Fla. Entomol.* 85: 1-13.
- Hoelmer, L.A. y Dahlsten, D.L.** 1993. Effects of malatión bait spray on *Aleyrodes spiraevoides* and its parasitoids in northern California. *Environ. Entomol.* 22: 49-56.
- Holland, J.M. y Luff, M.L.** 2000. The effects of agricultural practices on Carabidae in temperate agroecosystems. *Integrated Pest Mgmt. Rev.* 5: 109-129.
- Holliday, N.J. y Hagley, E.A.C.** 1984. The effect of sod type on the occurrence of ground beetles (Coleoptera: Carabidae) in a pest Management apple orchard. *Can. Ent.* 116: 165-171.
- Holling, C.S.** 1959a. Some characteristics of simple types of predation and parasitism. *Can. Entomol.* 91: 385-398.
- Holling, C.S.** 1959b. The components of predation as revealed by a study of small-mammal predation of the European pin sawfly. *Can. Entomol.* 91: 293-320.

**Holling, C.S.** 1965. Functional response of predators to prey density and its role in mimicry and population regulation. *Mem. Entomol. Soc. Can.* 45: 3-60.

**Holling, C.S.** 1966. The functional response of invertebrate predators to prey density. *Entomol. Soc. Can.* 48: 1-86.

**Holopainen, J.K. y Helenius, J.** 1992. Gut contents of ground beetles (Col., Carabidae) and activity of these and other epigeal predators during an outbreak of *Rhopalosiphum padi* (Hom., Aphididae). *Agric. Scand., Sect. B: Soil and Plant Sci.* 42: 57-61.

**Holt, R.D. y Lawton, J.H.** 1994. The ecological consequences of shared natural enemies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25: 495-520.

**Honek, A. y Martinkova, Z.** 2001. Aggregation of ground beetles (Carabidae, Coleoptera) on winter rape seeds dispersed on the ground. *Plant Prot. Sci.* 37: 97-102.

**Honek, A., Martinkova, Z. y Jarosik, V.** 2003. Ground beetles (Carabidae) as seed predators. *Eur. J. Entomol.* 100: 531-544.

**Hoogenboom, H.** 2005. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol.* 23: 1105-1116.

**Hoogenboom, H.R. y Winter, G.** 1992. By-passing immunization: Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. *J. Mol. Biol.* 227: 381-388.

**Hoogenboom, H.R., De Bruïne, A.P., Hufton, S.E., Hoet, R.M., Arends, J-W. y Roovers, R.C.** 1998. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4: 1-20.

**Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D., Johnson, K.S., Chiswell, D.J., Hudson, P. y Winter, G.** 1991. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: Methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucl. Acids Res.* 19: 4133-4137.

**Hoogendoorn, M. y Heimpel, G.E.** 2001. PCR-based gut content analysis of insect predators: using ribosomal ITS-1 fragments from prey to estimate predation frequency. *Mol. Ecol.* 10: 2059-2067.

**Hoogendoorn, M. y Heimpel, G.E.** 2002. PCR-based gut content analysis of insect predators: using ribosomal ITS-1 fragments from prey to estimate predation frequency, pp. 91-97. *En R.G., Van Derishe (ed.). Proceedings of the 1st International Symposium on*



Biological Control of Arthropods. USDA, Morgantown, WV. Honolulu, Hawaii, EEUU. Enero 2002.

**Hoy, M.A.** 2003. Insect Molecular Genetics. 2nd ed. Academic Press. San Diego, California, EEUU. 544pp.

**Itô, Y., Miyashita, K. y Sekiguchi, K.** 1962. Studies on the predators of the rice crop insect pests using the insecticidal check method. Japanese J. Ecol. 12: 1-11.

**Jacas, J-A., Urbaneja, A. y Viñuela, E.** 2006. History and future on introducción of exotic arthropod biological control agents in Spain: a dilemma? Biocontrol 51: 1-30.

**Jandricic, S., Scott-Dupree, C.D., Broadbent, A.B., Harris, C.R. y Murphy, G.** 2006. Compatibility of *Atheta coriaria* with other biological control agents and reduced-risk insecticides used in greenhouse floriculture integrated pest management programs for fungus gnats. Can. Entomol. 138: 712-722.

**Jarvis, K.J., Haas, F. y Whiting, M.F.** 2005. Phylogeny of earwigs (Insecta: Dermaptera) based on molecular and morphological evidence: reconsidering the classification of Dermaptera. Syst. Entomol. 30: 442-453.

**Jennings, V.H. y Tallamy, D.W.** 2006. Composition and abundance of ground-dwelling coleopteran in a fragmented and continuous forest. Environ. Entomol. 35: 1550-1560.

**Jones, M.G.** 1976. The carabid and staphylinid fauna of winter wheat and fallow on a clay flints soil. J. Appl. Ecol. 13: 775-791.

**Jones, M.G.** 1979. The abundance and reproductive activity on common Carabidae in a winter wheat crop. Ecol. Entomol. 4: 31-43.

**Jorgensen, H.B y Toft, S.** 1997. Role of granivory and insectivory in the life cycle of the carabid beetle *Amara similata*. Ecol. Entomol. 22: 7-15.

**Juen, A. y Traugott, M.** 2005. Detecting predation and scavenging by DNA gut-content analysis: a case study using a soil insect predator-prey system. Oecologia. 142: 344-352.

**Juen, A. y Traugott, M.** 2007. Revealing species-specific trophic links in soil food webs: molecular identification of scarab predators. 16: 1545-1557.

**Juliano, S.A.** 2001. Nonlinear curve fitting. Predation and functional response curves, pp 178-196. En Scheiner, S.M. y Gurevitch, J. (eds). Desing and analysis of ecological experiments. Oxford University Press. Oxford, UK.

- Karu, A.E., Bell, C.W. y Chin, T.E.** 1995. Recombinant antibody technology. *ILAR J.* 37: 3.
- Kaspar, M.L., Reeson, A.F., Cooper, S.J.B., Perry, K.D. y Austin, A.D.** 2004. Assessment of prey overlap between a native (*Polistes humilis*) and an introduced (*Vespula germanica*) social wasp using morphology and phylogenetic analysis of 16S rDNA. *Mol. Ecol.* 13: 2037-2048.
- Kielty, J.P., Allen-Williams, L.J., Underwood, N. y Eastwood, E.A.** 1996. Behavioral responses of three species of ground beetle (Coleoptera: Carabidae) to olfactory cues associated with prey and habitat. *J. Insect Behavior* 9: 237-250.
- King, R.A., Read, D.S., Traugott, M. y Symondson W.O.C.** 2008. Molecular analysis of predation: a review of best practice of DNA-based approaches. *Mol. Ecol.* 17: 947-963.
- Köhler, G. y Milstein, C.** 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
- Kromp, B.** 1999. Carabid beetles in sustainable agriculture: a review on pest control efficacy, cultivation impacts and enhancement. *Agr. Ecosyst. & Env.* 74: 187-228.
- Kromp, B. y Nitzlader, M.** 1995. Dispersal of ground beetles in a rye field in Vienna, Eastern Australia. *En Toft, S., Riedel, W. (eds). Arthropod Natural Enemies in Arable Land I. Density Spatial Heterogeneity and Dispersal. Acta Jutlandica.* 70: 269-277.
- Krooss, S. y Schaefer, M.** 1998. The effect of different farming systems on epigeic arthropods: a five-year study on the rove beetle fauna (Coleoptera: Staphylinidae) of winter wheat. *Agr. Ecosyst & Env.* 69: 121-133.
- Landis, D.A., Wratten, S.D. y Gurr, G.M.** 2000. Habitat Management to Conserve Natural Enemies of Arthropod Pest. *Ann. Rev. Entomol.* 45: 175-201.
- Lang, A., Filser, J. y Henschel, R.** 1999. Predation by ground beetles and wolf spiders on herbivorous insects in a maize crop. *Agric.. Ecosyst. & Env.* 72: 189-199.
- Langmaack, M., Land S., y Büchs, W.** 2001. Effects of different field management systems on the carabid coenosis in oil seed rape with special respect to ecology and nutritional status of predacious *Poecilus cupreus* L. (Col., Carabidae). *J. Appl. Entomol.* 125: 313-320.
- Latorre, A., Moya, A. y Ayala, F.J.** 1986. Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8649-8653.

- Lee, S.M. y Chao, A.** 1994. Estimating population size via sample coverage for closed capture-recapture models. *Biometrics* 50: 88-97.
- Lenfant, C., Lyoussoufi, A., Chen, X., D'Arcier, F.F. y Sauphanor, B.** 1994. Potentialités prédatrices de *Forficula auricularia* sur le psylle du Poirier *Cacopsylla pyri*. *Entomol. Exp. Appl.* 73: 236-243.
- Lerner, R.A., Kang, A.S., Bain, J.D., Burton, D.R. y Barbas, C.F.** 1992. Antibodies without immunitation. *Science* 258: 1313-1314.
- Lim, U.T. y Lee, J-H.** 1994. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay used to analyze predation of *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) by *Pirata subpiraticus* (Araneae: Lycosidae). *Environ. Entomol.* 28: 1177-1182.
- Lindroth, C.H.** 1992. Ground Beetles (Carabidae) of Fennoscandia. A zoogeographic study Part III, Smithsonian Institution Libraries and National Science Foundation, Washington DF, EEUU. 814pp.
- Linquist, D.** 2000. Pest Management strategies: area-wide and convencional. *En Tan*, K.H. (ed). Area-Wide Management of Fruit Flies and other Major Insect Pests. Penag. University Sains Malaysia Press. Malaysia. 782pp.
- Liquido, N.J., Shinoda, L.A. y R.T. Cunningham.** 1991. Host plants of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae): an annotated world review. Lanham: ESA. Entomological Society of America, Miscellaneous Publications, 77. EEUU.
- Logino, J.T., Coddington, J. y Colwell, R.K.** 2002. The ant fauna of a tropical rain forest: Estimating species richness three different ways. *Ecology* 83: 689-702.
- Losey, J.E. y Denno, R.F.** 1998. Positive predator-predator interactions: enhanced predation rates and synergistic suppression of aphid populations. *Ecology* 79: 2143-2152.
- Loughridge, A.H. y Luff, M.L.** 1983. Aphid predation by *Harpalus rufipes* (Degeer) (Coleoptera: Carabidae) in the laboratory and field. *J. Appl. Ecol.* 20: 451-462.
- Lövei, G. y Sároszpataki, M.** 1990. Carabid beetles in agricultural fields of Eastern Europe, pp 87-93. *En Stork, N.E., (ed). The Role of Ground Beetles in Ecological and Environmental Studies.* Intercept, Andover. London, UK. 250 pp.
- Lövei, G.L y Sunderland, K.D.** 1996. Ecology and behavior of ground beetles (Coleoptera: Carabidae). *Ann. Rev. Entomol.* 41: 231-236.

- Luczak, J.** 1975. Studies on the crop field ecosystem part 1.-10 spider communities of the crop fields. Polish Ecological Studies 1: 93-110.
- Luczak, J.** 1979. Spiders in agrocoenoses. Pol. Ecol. Stud. 5: 151-200.
- Luff, M.L.** 1980. The biology of the ground beetle *Harpalus rufipes* in a strawberry field in Northumberland. Ann. Appl. Biol. 94: 153-164.
- Luff, M.L.** 1987. Biology of polyphagous ground beetles in agriculture. Agric. Zool. Rev. 2: 237-278.
- Lys, J.A.** 1995. Observation of epigeic predators and predation on artificial prey in a cereal field. Entomol. Exp. Appl. 75: 265-272.
- Ma, J., Li, D., Keller, M., Schmidt, O. y Feng, X.** 2005. A DNA marker to identify predation of *Plutella xylostella* (Lep., Plutellidae) by *Nabis kinbergii* (Hem., Nabidae) and *Lycosa* sp (Aranea, Lycosidae). J. Appl. Entomol. 129: 330-335.
- Magaña, C., Hernández-Crespo, P., Ortego, F. y Castañera, P.** 2007. Resistance to malathion in field populations of *Ceratitis capitata*. J. Econ. Entomol. 1000: 1836-1843.
- Magurran, A.E.** 1998. Ecological diversity and its measurement. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, EEUU. 192 pp.
- Magurran, A.E.** 2004. Measuring biological diversity. Blackwell Publishing. Oxford, UK. 256 pp.
- Magurran, A.E., y Henderson, P.A.** 2003. Explaining the excess of rare species in natural species abundance distributions. Nature: 422: 714-716.
- Malecki, M. Hsu, A., Truong, L. y Sanchez, S.** 2002. Molecular immunolabeling with recombinant single-chain variable fragment (scFv) antibodies designed with metal-binding domains. PNAS 99: 213-218.
- Manley, G.V.** 1971. A seed-cacheing carabid (Coleoptera). Ann. Entomol. Soc. Am. 64: 1474-1475.
- Mansour, F. y Heimbach U.** 1993. Evaluation of Lycosid, Micryphantid and Linyphiid Spiders As Predators of *Rhopalosiphum padi* (Hom, Aphididae) and Their Functional-Response to Prey Density - Laboratory Experiments. Entomophaga 38: 79-87.

- Mansour, F. y Whitecomb, W.H.** 1986. The spiders of a citrus grove in Israel and their role as biocontrol agents of *Ceroplastes floridensis* [Homoptera: Ciccudae]. *Entomophaga* 31: 269-267.
- Mansour, F., Rosen, D., Shulov, A. y Plaut, H.N.** 1980. Evaluation of spiders as biological control agents of *Spodoptera littoralis* larvae on apple in Israel. *Acta Oecol.* 01: 225-232.
- Marc, P. y Canard, A.** 1997. Maintaining spider biodiversity in agroecosystems as a tool in pest control. *Agr. Ecosyst. & Env.* 62: 229-235.
- Markgraf, A. y Basedow, T.** 2002. Flight activity of predatory Staphylinidae in agriculture in central Germany. *J. Appl. Ent.* 126: 79-81.
- MARM.** 2007. Anuario de Estadística Agroalimentaria y Pesquera Año 2007. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.  
<http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/anuario/introduccion.htm>. Acceso 12 julio de 2009.
- Marshall, E.J.P., Brown, V.K., Boatman, N.D., Lutmans, P.J.W., Squire, G.R. y Ward, L.K.** 2003. The role of weeds in supporting biological diversity within crop fields. *Weed Res.* 43: 077-089.
- McCarty, M.T., Shepard, M. y Turnipseed, G.** 1980. Identification of predaceous arthropods in soybeans by using autoradiography. *Environ. Entomol.* 9: 199-203.
- Mellado, L.** 1971. La técnica de machos estériles en el control de la mosca del Mediterráneo. Programas realizados en España. *En Sterility principle for insect control or eradication.* International atomic energy agency, Vienna, Austria STI/Pub. 265: 49-54.
- Mellado, L. Arrollo, M. y Ros, P.** 1974. Control de *Ceratitis capitata* Wied. by the sterile technique in Spain. *In The sterile-male technique and its field applications.* International atomic energy agency, Vienna, Austria. STI/Pub. 364: 63-73.
- Merfield, C.N., Wratten, S.D. y Navntof, S.** 2004. Video analysis of predation by polyphagous invertebrate predators in the laboratory and field. *Biol. Control.* 29: 5-13.
- Miller, M.C.** 1981. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay of narrow-and broad-spectrum anti-adult southern pin beetle serum. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 74: 279-282.

- Miñarro, M., Espadaler, X., Melero, V.X. y Suárez-Álvarez, V.** 2009. Organic versus conventional management in an apple orchard: effects of fertilization and tree-row management on ground-dwelling predaceous arthropods. *Agric. Forest Entomol.* 11: 133-142.
- Moner, J.P., Petit, V.R. y Bernat, J.M.** 1988. La mosca de las frutas (*Ceratitis capitata* Wied.). Generalitat Valenciana, Conselleria d'Agricultura i Pesca, Servei de Protecció dels Vegetals. 60pp.
- Monteith, L.G.** 1975. Laboratory feeding studies of potential predators of the apple maggot, *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae) in Ontario. *Proc. Entomol. Soc. Ont.* 106: 28-33.
- Moreno, C.R., Lewins, S.A. y Barbosa, P.** 2010. Influence of relative abundance and taxonomic identity on the effectiveness of generalist predators as biological control agents. *Biol. Control* 52: 96-103.
- Moreno, D.S. y Mangan, R.L.** 2003. Bait matrix for novel toxicants for use in control of fruit flies (Diptera: Tephritidae), pp 333-362. *En* Schwalbe, C. (ed). *Invasive arthropods in agriculture*. Science Publishers, Inc. Enfield NH, EEUU.
- Mueller, T.F., Blommers, L.H.M. y Mols, P.J.M.** 1988. Earwig (*Forficula auricularia*) predation on the woolly apple aphid, *Eriosoma lanigerum*. *Entomol. Exp. Appl.* 47:145-152.
- Navarro-Llopis, V., Sanchis-Cabanes, J., Ayala, I., Casana-Giner, V. y Primo-Yufera, E.** 2004. Efficacy of lufenuron as chemosterilant against *Ceratitis capitata* in field trials. *Pest. Manag. Sci.* 60: 914-920.
- Navarro-Llopis, V., Sanchis-Cabanes, J., Primo-Millo, J. y Primo-Yufera, E.** 2007a. Chemosterilants as control agents of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) in field trials. *Bull. Entomol. Res.* 97: 359-368.
- Navarro-Llopis, V., Domínguez-Ruiz, J., Sanchis-Cabanes, J. y Primo-Millo, J.** 2007b. Aplicación del método quimioesterilizantes para el control de *Ceratitis capitata* (Wiedemann). *Monografía Ceratitis capitata*. Levante Agrícola 385: 177-180.
- Nicholas, A.H., Spooner-Hart, R.N. y Vickers, R.A.** 2005. Abundance and natural control of the woolly aphid *Eriosoma lanigerum* in an Australian apple orchard IPM programme. *BioControl* 50: 271-291.

- Nicholas, K.B., Nicholas, J.H.B. y Deerfield II, D.W.** 1997. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. EMBNET.news 4: 1-4.
- Nichols, E., Larsen, T., Spector, S., Davis, A.L., Escobar, F., Favila, M. y Vulinec, K.** 2007. Global dung beetle response to tropical forest modification and Fragmentation: a quantitative literature review and meta-analysis. Biol. Conserv. 137: 1-19.
- Nienstedt, K.M. y Poehling, H-M.** 2004. Invertebrate predation of <sup>15</sup>N-marked prey in semi-field wheat enclosures. Entomol. Exp. Appl. 112: 191-200.
- Nyffeller, M. y Benz, G.** 1997. Spiders in natural pest control: a review. J. Appl. Entomol. 103: 321-339.
- Nyffeller, M. y Sunderland, K.D.** 2003. Composition, abundance and pest control potential of spider communities in agroecosystems: a comparison of European and US studies. Agric. Ecosyst. & Environ. 95: 579-612.
- Oraze, M.J. y Grigarick, A.A.** 1989. Biological control of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) and midges (Diptera: Chironomidae) by *Pardosa ramulisa* (Araneae: Lycosidae) in California USA rice fields. J. Econ. Entomol. 82: 745-749.
- Oraze, M.J., Grigarick, A.A. y Smith, K.A.** 1989. Population ecology of *Pardosa ramulosa* (Araneae, Lycosidae) in flooded rice fields of Northern California. J. Arachnol. 17: 163-170.
- Ortego, F., Magaña, C., Hernández-Crespo, P. y Castañera, P.** 2005. Detección de resistencia a insecticidas en *Ceratitis capitata*: bases bioquímicas y moleculares. Phytoma España 173: 63-66.
- Palacios, R., Martínez, M.T. y Cerdà X.** 1999. Composición, abundancia y fenología de las hormigas (Hymenoptera: Formicidae) en campos de cítricos de Tarragona. Bol. San. Veg. Plagas 25: 229-240.
- Papadopoulos, N.T., Carey, J.R., Katsoyannos, B.I. y Kouloussis, N.A.** 1996. Overwintering of the mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in northéeme Greece. Ann. Entomol. Soc. Am. 89: 526-534.
- Papadopoulos, N.T., Katsoyannos, B.I., Koloussis, N.A., Hendrichs, J., Carey, J.R. y Heath, R.R.** 2001. Early detection and Population Monitoring of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in a Mixed-Fruit Orchard in Northern Greece. J. Econ. Entomol. 94: 971-978.

- Parkin, E.J. y Butlin, R.K.** 2004. Within- and between-individual sequence variation among ITS1 copies in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus* indicates frequent intrachromosomal gen conversion. *Mol. Biol. Evol.* 21:1595-1601.
- Pearson, D.L. y Vogler, A.P.** 2001. Tiger Beetles: The Evolution, Ecology, and Diversity of Cicindelids. Comstock Publishing Associates. Cornell University Press. EEUU. 352pp.
- Peck, S.B. y Thayer, M.K.** 2003. The cave-inhabiting rove beetles of the United States (Coleoptera; Staphylinidae; exlluding Aleocharinae and Pselaphinae): Diversity and distributions. *J. Cave Karst Stud.* 65: 3-8.
- Pekár, S.** 2005. Predatory characteristics of ant-eating *Zodarion* spiders (Araneae: Zodariidae): Potential biological control agents. *Biol. Control* 34: 196-203.
- Phillips, M.L.** 1981. The ecology of the common earwig *Forficula auricularia* in apple orchards. Tesis doctoral. University of Bristol, UK.
- Pimm, S.L.** 1991. The balance of nature? Ecological issues in the conservation of species and communities. University of Chicago Press, Chicago, USA. 448pp.
- Piñol, J., Espadaler, X., Cañellas, N. y Pérez, N.** 2009. Effects of the concurrent exclusion of ants and earwigs on aphid abundance in an organic citrus grove. *BioControl.* 54: 515-527.
- Platnick, N.I.** 2009. The World Spider Catalog, version 9.5. American Museum of Natural History.
- Powell, W., Dean, D.A. y Dewar, A.** 1985. The influence of weeds on polyphagous arthropod predators in winter wheat. *Crop. Prot.* 4: 298-312.
- Preston, F.W.** 1948. The commonness, and rarity, of species. *Ecology* 29: 254-283.
- Primo-Millo, E., Alfaro-Lassala, F. y Argilés-Herrero, R.** 2003. Plan de actuación contra la mosca de las frutas (*Ceratitis capitata*) en la Comunidad Valenciana. *Phytoma España* 153: 127-130.
- Purcell, M.F.** 1998. Contribution of biological control to integrated pest management of tephritidae fruit flies in the tropic and subtropics. *Int. Pest. Manag. Rev.* 3: 63-83.
- Raaijmakers, J.G.W.** 1987. Statistical analysis of the Michaelis-Menten equation. *Biometircs* 43: 793-803.



- Ragsdale, D.W., Larson, A.D. y Newsom, L.D.** 1981. Quantitative assessment of the predators of *Nezara viridula* eggs and nymphs within a soybean agroecosystem using an ELISA. *Environ. Entomol.* 10: 402-405.
- Richards, O.W. y Davies, R.G.** 1984. Tratado de Entomología Imms vol II. Clasificación y Biología. Ed. Omega SA. Barcelona, España. 998pp.
- Riechert, S.E.** 1982. Spiders as representative "sit and wait" predators, pp 313-328. *En* Crawley M.J. (ed). *Natural Enemies: The Population Biology of Predators, Parasites, and Diseases*. Blackwell Scientific Publications. Boston, EEUU.
- Riechert, S.E. y Lockley, T.** 1984. Spiders as Biological-Control Agents. *Ann. Rev. Entomol.* 29: 299-320.
- Riechert, S.E. y Bishop, L.** 1990. Prey control by an assemblage of generalist predators: spiders in a garden test system. *Ecology* 7: 1441-1450.
- Riechert, S.E. y Lawrence, K.** 1997. Test for predation effects of single versus multiple species of generalist predators: spiders and their insect prey. *Entomol. Exp. Appl.* 84: 147-155.
- Robinson, A.S. y Hooper, G.** 1989. Fruit flies, their biology, natural enemies and control. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. 464pp.
- Rogers, D.,** 1972. Random Search and Insect Population Models. *J. Anim. Ecol.* 41: 369-383.
- Royama, T.** 1971. A comparative study of models for predation and parasitism. *Res. Popul. Ecol.* 1: 1-91.
- Rychlik, W.** 1992. OLIGO 4.06, Primer Analysis Software. National Biosciences Inc. Publishers, Plymouth, USA.
- Sabelis, M.W.** 1992. Predatory arthropods, pp 225-266. *En* *Natural Enemies: The Population Biology of Predators, Parasites and Diseases*. Blackwekk Sci. Oxford, UK. 576pp.
- Samu, F. y Biró, Z.** 1993. Functional-Response, Multiple Feeding and Wasteful Killing in a Wolf Spider (Araneae, Lycosidae). *Eur. J. Entomol.* 90: 471-476.
- Samu, F., Sunderland, K.D. y Szinetár, C.** 1999. Scale-dependent dispersal and distribution of spiders in agricultural systems: a review. *J. Arachnol.* 23: 325-332.

- Samways, M.J.** 1990. Species temporal variability: epigeic ant assemblages and management for abundance and scarcity. *Oecologia* 84: 482-490.
- San Andrés, V.** 2008. Estrategias para la Mejora del Control Autocida de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) en cítricos. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- San Andrés, V., Pérez-Panades, J., Carbonell, E.A., Castañera, P. y Urbaneja, A.** 2009. Effects of post-teneral nutrition and Ginger root oil exposure on longevity and mortality in bait treatments of sterile male *Ceratitis capitata*. *Entomol. Exp. Appl.* 132: 256-263.
- SAS** 2004. Versión 9.1.3. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Schenk, D. y Bacher, S.** 2004. Detection of shield beetle remains in predators using a monoclonal antibody. *J. Appl. Entomol.* 128: 273-278.
- Schmidt, M.H., Lauer, A., Purtauf, T., Thies, C., Schaefer, M. y Tscharncke, T.** 2003. Relative importance of predators and parasitoids for cereal aphid control. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol.]* 270: 1905-1909.
- Schmidt, M.H., Roschewitz, I., Thies, C. y Tscharncke T.** 2005. Differential effects of landscape and management on diversity and density of ground-dwelling farmland spiders. *J. Appl. Ecol.* 42: 281-287.
- Schoof, D.D., Palchick, S. y Tempelis, C.H.** 1986. Evaluation of predator-prey relationships using an enzyme immunoassay. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79: 91-95.
- Schremmer, F.** 1960. Beitrag zur Biologie von *Ditomus clypeatus* Rossi, eines körnersammelnder Carabiden. *Z. Arbeitsgem. Österr. Entomol.* 3: 140-146.
- SECUGEN** 2008. Secuenciación de plásmidos directamente de colonia.  
<http://www.secugen.es/pdf/PLASMIDOS.pdf>
- Settle, W.H., Ariawan, H., Astuti, E.T., Cahyana, W.A.L., Hindayana, D. y Sri Lestari, A.** 1996. Managing Tropical Rice Pests Through Conservation of Generalist Natural Enemies and Alternative Prey. *Ecology* 77: 1975-1988.
- Sheppard, S.K. y Harwood, J.D.** 2005. Advances in molecular ecology: tracking trophic links through predator-prey food-webs. *Funct. Ecol.* 19: 752-762.

- Sheppard, S.K., Bell, J., Sunderland, K.D., Fenlon, J., Skervin, D. y Symondson, W.O.C.** 2005. Detection of secondary predation by PCR analyses of the gut contents of invertebrate generalist predators. *Mol. Ecol.* 14: 4461-4468.
- Skalski, G.T y Gilliam, J.F.** 2001. Functional responses with predator interference: viable alternatives to the Holling Type II model. *Ecology* 82: 3083-3092.
- Snowball, G.J. y Lukins, R.G.** 1966. Status of introduced parasitoids of Queensland fruit fly (*Strumeta tryoni*), 1962-1965. *Aust. J. Agric. Res.* 17: 719-739.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J.** 1995. *Biometry: the Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, 3rd ed. W. H. Freeman. New York, EEUU. 880pp.
- Solomon, M.E.** 1949. The natural control of animal populations. *J. Anim. Ecol.* 18: 1-35.
- Solomon, M.G., Cross, J.V., Fitzgerald, J.D., Jolly, C.A.M., Olszak, R.W., Niemczyk, E. y Vogt, H.** 2000. Biocontrol of pests of apples and pears in Northern and Central Europe, 3. Predators. *Biocontrol Sci. Technol.* 10: 91-128.
- Sorokin, N.S.** 1981. Ground beetles (Col: Carabidae) natural enemies of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Sau. *Entomol. Obozr.* 60: 282-289.
- Spence, J.R. y Niemelä, J.K.** 1994. Sampling carabid assemblages with pitfall traps: the madness and the method. *Can. Entomol.* 126: 881-894.
- SPSS** 1999. Manual del usuario, versión 10.0 para Windows 98. SPSS, Chicago, IL. Chicago, IL.
- Staden Package** 2003. Free package software.  
<http://staden.sourceforge.net/>
- Stark, J.D., Vargas, R. y Miller, N.** 2004. Toxicity of spinosad in proteína bait to three economically important tephritid fruit fly species (Diptera: Tephritidae) and their parasitoids (Hymenoptera: Braconidae). *J. Econ. Entomol.* 97: 911-915.
- Steck, G.J., Gasparich, G.E., Han, H.Y., McPheron, B. y Sheppard, W.S.** 1996. Distribution of mitochondrial DNA haplotypes among *Ceratitis capitata* populations Worldwide, pp 291-296. *En* McPheron, B. y Steck G.J. (eds). *Fruit fly pest. A World Assessment of their Biology and Management*. Delray Beach, FL. St. Lucie Press. EEUU. 608pp.

- Stuart, R.J., Jackson, I.W. y McCoy, C.W.** 2003. Predation on neonate larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in Florida citrus: Testing for daily patterns of neonate drop, ant predators and chemical repellence. *Fla. Entomol.* 86: 61-72.
- Suckling, D.M., Burnip, G.M., Hackett, J. y Daly, J.C.** 2006. Frass sampling and bating indicate European earwig (*Forficula auricularia*) foraging in orchards. *J. Appl. Entomol.* 130: 263-267.
- Sunderland, K.D.** 1988. Quantitative methods for detecting invertebrate predation occurring in the field. *Ann. Appl. Biol.* 112: 201-224.
- Sunderland, K.D.** 1992. Effects of pesticides on the population ecology of polyphagous predators. *Aspects Appl. Biol.* 31:19-28.
- Sunderland, K.D.** 1996. Progress in quantifying predation using antibody techniques, pp 419-455. *En Symondson, W.O.C. y Liddell, J.E. (eds). The ecology of agricultural pests, biochemical approaches.* Chapman & Hall. London. UK. 532pp.
- Sunderland, K.D.** 1999. Mechanisms underlying the effects of spiders on pest populations. *J. Arachnol.* 27: 308-316.
- Sunderland, K.D., Axelsen, J.A., Dromph, K., Freier, B., Hemptinne, J-L., Holst, N.H., Mols, P.J.M., Petersen, M.K., Powell, W., Ruggle, P., Triltsch, H. y Winder, L.** 1997. Pest control by a community of natural enemies. *Acta Jutl.* 72: 271-326.
- Sunderland, K.D., y Samu, F.** 2000. Effects of agricultural diversification on the abundance, distribution, and pest potential control of spiders: a review. *Entomol. Exp. Appl.* 95: 001-013.
- Sunnucks, P. y Hales, D.F.** 1996. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Mol. Biol. Evol.* 13: 510-524.
- Symondson, W.O.C.** 2002. Molecular identification of prey in predator diets. *Mol. Ecol.* 11: 627-641.
- Symondson, W.O.C. y Liddell, J.E.** 1993. The development and characterisation of an anti-haemolymph antiserum for the detection of mollusc remains within carabid beetles. *Biocontrol Sci. Techn.* 3: 261-275.

- Symondson, W.O.C., Erickson, M.L. y Liddell, J.E.** 1997. Species-specific detection of predation by Coleoptera on the Milacid slug *Tandonia budapestensis* (Mollusca: Pulmonata). *Biocontrol Sci. Techn.* 7: 457-465.
- Symondson, W.O.C., Glen, D.M., Erickson, M.L., Liddell, J.E. y Langdon, C.J.** 2000. Do earthworms help to sustain the slug predator *Pterostichus melanarius* (Coleoptera: Carabidae) within crops? Investigations using monoclonal antibodies. *Mol. Ecol.* 9: 1279-1292.
- Symondson, W.O.C., Sunderland, K.D. y Greenstone, M.H.** 2002a. Can generalist predators be effective biocontrol agents? *Annu. Rev. Entomol.* 47: 561-594.
- Symondson, W.O.C., Glen, D.M., Ives, A.R., Langdon, C.J., y Wiltshire, C.W.** 2002b. Dynamics of the relationship between a generalist predator and slugs over five years. *Ecology* 83: 137-147.
- Thiele, H.U.** 1977. Carabid Beetles in their Environments. Springer-Verlag. Berlin. Alemania. 369pp.
- Thomas, R.S., Harwood, J.D., Glen, J.D. y Symondson, W.O.C.** 2009. Tracking predator density dependence and subterranean predation by carabid larvae on slugs using monoclonal antibodies. *Ecol. Entomol.* On line. DOI: 10.1111/j.1365-2311.2009.01104.x
- Thompson, D.J.** 1978. Towards a realistic predator-prey model: the effect of temperature on the functional response and life history of larvae of the damselfly *Ischnura elegans*. *J. Anim. Ecol.* 47: 757-767.
- Thompson, J.N.** 1984. Insect diversity and the trophic structure of communities, pp. 591-606. *En* Huffaker, C.B. y R.L., Rabb (eds). *Ecological Entomology*. John Wiley. New York. USA. 844pp.
- Tokeshi, M.** 1993. Power fraction: a new explanation of relative abundance patterns in species-rich assemblages. *Oikos* 75: 543-550.
- Tolonen, T.** 1995. Importance of generalist epigeal predator species in a cereal field: predation on baits. *J. Appl. Entomol.* 119: 113-117.
- Topping, C.J. y Sunderland, K.D.** 1992. Limitations to the use of pitfall traps in ecological studies exemplified by a study of spiders in a field of winter wheat. *J. Appl. Entomol.* 29: 485-491.

- Traugott, M.** 2003. The prey spectrum of larval and adult *Cantharis* species in arable land: an electrophoretic approach. *Pedobiologia* 47: 161-169.
- Trexler, J.C., Charles, E.M. y Travis, J.** 1988. How can functional response best be determined?. *Oecologia* 76: 206-214.
- Triltsch, H.** 1997. Gut contents in field sample adults of *Coccinella septempunctata* (Col. Coccinellidae). *Entomophaga*, 42: 25-131.
- Urbaneja, A., García-Marí, F., Tortosa, D., Navarro, C., Vanaclocha, P., Vargues, L. y Castañera, P.** 2006. Influence of ground predators on the survival of the Mediterranean fruit fly pupae, *Ceratitis capitata*, in Spanish citrus orchards. *BioControl* 51: 611-626.
- Urbaneja, A., Jacas, J-A. y García-Marí, F.** 2009a. Control Biológico en Cítricos. *En* Jacas, J-A. y Urbaneja, A. (eds). Control Biológico de Plagas Agrícolas. Phytoma España. 480pp.
- Urbaneja, A., Chueca, P., Montón, H., Pascual-Ruiz, S., Dembilio, O., Vanaclocha, P., Abad-Moyano, R., Pina, T. y Castañera, P.** 2009b. Chemical alternatives to Malathion for controlling *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), and their side effects on natural enemies in Spanish citrus orchards. *J. Econ. Entomol.* 102: 144-151.
- Viñuela, E., del Estal, P., Arroyo, M., Adán, A., Budía, F., Jacas, J-A. y Marco, V.** 1992. Los artrópodos: características. Los insectos: órdenes. Monografía 128. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid, España.
- Völkl, W.** 1992. Aphids or their parasitoids: Who actually benefits from ant-attendance?. *J Anim Ecol.* 61: 273-281.
- Walrant, A. y Loreau, M.** 1995. Comparison of iso-enzyme electrophoresis and gut content examination for determining the natural diets of the groundbeetle species *Abax ater* (Coleoptera: Carabidae). *Entomol. Gen.* 19: 253-259.
- Weems, H.V.** 1981. Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Entomol. Circ.* 230. Flo. Dept. Agric. Consum. Ser., Div. Plant Indus. 8pp.
- Wesson, D.M., Porter, C.H. y Collins, F.H.** 1992. Sequence and secondary structure comparisons of ITS rDNA in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 1: 253-269.

- Weyman, G.S., Sunderland, K.D. y Jepson, P.C.** 2002. A review of the evolution and mechanisms of ballooning by spiders inhabiting arable farmland. *Ethol. Ecol.* 29: 485-491.
- Whittaker, R.H.** 1965. Dominance and diversity in land plant communities. *Science* 147: 250-260.
- Whittaker, R.H.** 1972. Evolution an measurement of species diversity. *Taxo.* 21: 213-251.
- Winder, L.** 1990. Predation of the cereal aphid *Sitobion avenae* by polyphagous predators on the ground. *Ecol. Entomol.* 15: 105-110.
- Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. y Hoogenboom, H.R.** 1994. Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433-455.
- Wise, D.H.** 2006. Cannibalism, Food Limitation, Intraspecific Competition, and the Regulation of Spider Populations. *Ann. Rev. Entomol.* 51: 441-465.
- Wong, M. y Wong, T.** 1998. Predation of the Mediterranean fruit fly and the Oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) by the Fire Ant (Hymenoptera: Formicidae) in Hawaii. *Proc. Hawaii. Entomol. Soc.* 28: 169-177.
- Wong, T.T.Y., Ramadan, M.M., McInnis, D.O., Mochizuki, N., Nishimoto, J.I. y Herre, J.C.** 1991. Augmentative releases of *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae) to suppress a Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) population in Kula, Maui, Hawaii. *Biol. Control* 1: 2-7.
- Wyss, E.**, 1995. The effects of weed strips on aphids and aphidophagous predators in an apple orchard. *Entomol. Exp. Appl.* 75: 43-49.
- Wyss, E., Niggli, U. y Nentwig, W.** 1995. The impact of spiders on aphid population in a strip-managed apple orchard. *J. Appl. Entomol.* 119: 473-478.
- Zaidi, R.H., Jaal, Z., Hawkes, N.J., Hemingway, J. y Symondson, W.O.C.** 1999. Can multiple-copy sequences of prey DNA be detected amongst the gut contents of invertebrate predators?. *Mol. Ecol.* 8: 2081-2087.
- Zhang, Z.Q.** 1992. The natural enemies of *Aphis gossypii* (Hom., Aphididae) in China. *J. Appl. Entomol.* 114: 251-262.